

N = 6.76%; found: C = 66.68, H = 7.30, N = 6.90%) m.p. 235–239.5°, $[\alpha]_D = -101 \pm 3^\circ$ (CHCl₃) is obtained (U.V. Spectrum, Fig. 1 (dotted line); I.R. Spectrum, Fig. 3).

U.V. Spectra in ethanol.

	λ_{\max}	$\log \epsilon$	λ_{\min}	$\log \epsilon$
Reserpin . . .	218	4.739	246	3.889
	268	4.204	288	3.985
	294–296	3.995		
Methyl Reserpate	228	4.488	252	3.493
	270–272	3.667	282	3.579
	298	3.779		

This methylreserpate, which is a basic compound, on being acted upon by trimethoxybenzoylchloride yields the alkaloid reserpine back with the same physical characteristics and identical spectra as the starting material; m.p. 264–266°, mixed m.p. 263–265° (inserted into the block at 250°) (found C = 65.38, H = 6.45, N = 4.80%). Also the pharmacological activity of the synthetic material is the same as the alkaloid obtained from the plant material¹. This sequence of reactions shows that the molecule of reserpine has not suffered from any rearrangements during alkaline hydrolysis and retransformation into the parent alkaloid.

A. FURLENMEIER, R. LUCAS,
H. B. MACPHILLAMY,
J. M. MÜLLER, and E. SCHLITTLER

Ciba Pharmaceutical Research Laboratories, Basle, Switzerland, and Summit, N. J., June 3, 1953.

Zusammenfassung

Durch alkalische Hydrolyse wird Reserpin in Reserpinsäure, 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure und Methanol gespalten. Das Esteralkaloid liess sich aus diesen Spaltstücken wieder resynthetisieren.

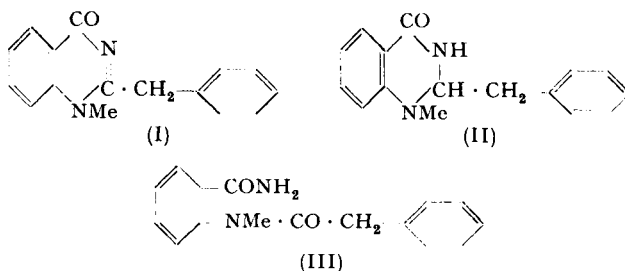
¹ These experiments were carried out by Dr. A. J. PLUMMER and his associates.

Chemistry of Arborine

In a paper awaiting publication¹ a number of degradations of arborine, C₁₆H₁₄ON₂, the major alkaloid of *Glycosmis arborea*², has been described in detail. It has been observed that sodalime distillation of arborine affords toluene, methylaniline and ammonia and that hydrolysis of arborine with alkali affords N-methylantranilamide, N-methylantranilic acid, phenylacetic acid and ammonia along with a minute quantity of a weakly acidic product, arboricine, C₁₆H₁₃O₂N.

It has now been found that dihydroarborine, C₁₆H₁₆ON₂, m.p. 199–200°, is readily hydrolysed with dilute acid. N-methylantranilamide, N-methylantranilic acid and phenylacetaldehyde have been isolated from the product. From a consideration of these results and the general behaviour of arborine and dihydroarborine it appears

that arborine is 1-methyl-2-benzyl-4(1 H)-quinazoline (I) and that dihydroarborine is (II).



The above structure for arborine has been confirmed by synthesis. For this purpose, phenylacetyl chloride has been condensed with N-methylantranilamide to give N-methyl-N-phenylacetylantranilamide (III), m.p. 159–160°. This on heating to 170–190° gives arborine (mixed m.p. compared).

(Mrs.) D. CHAKRAVARTI,
R. N. CHAKRAVARTI, and
S. C. CHAKRAVARTI

Departments of Chemistry, Bethune College and School of Tropical Medicine, Calcutta, April 18, 1953.

Zusammenfassung

Aus den Abbauprodukten von Arborin und Dihydroarborin konnte für Arborin, das Hauptalkaloid von *Glycosmis arborea*, die Formel eines 1-Methyl-2-benzyl-4-(1 H)-chinazolons erschlossen werden. Diese Formel wurde durch Synthese bestätigt.

Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel

Nebennierenextrakte enthalten ein der Rinde entstammendes kompliziertes Gemisch von Steroiden¹. Von diesen können drei, nämlich Corticosteron, Cortison und 17-Oxycorticosteron, sicher als Hormone bezeichnet werden, da sie im Blut in Mengen vorkommen², die für gewisse natürliche Funktionen der Nebennierenrinde von massgebender Bedeutung sind. Diese drei Stoffe vermögen zwar die Wirkung der Drüse auf den Kohlehydrat- und Proteinstoffwechsel weitgehend zu erklären, nicht jedoch diejenige auf den Mineralstoffwechsel (gemessen an der Na- und Wasser-Retention und K-Exkretion). Von allen bekannten reinen Steroiden besitzt Cortexon (= 11-Desoxycorticosteron) die stärkste Wirkung auf den Mineralstoffwechsel im genannten Sinn. Dieser Stoff kommt zwar in Nebennierenextrakten vor³ und anscheinend auch im Rinderblut⁴; die darin

¹ T. REICHSTEIN und C. W. SHOPPEE, *The Hormones of the Adrenal Cortex*, Vitamins and Hormones, Bd. 1, hg. v. R. S. HARRIS und K. V. THIMANN (Academic Press Inc., New York 1943), S. 345.

² D. H. NELSON, H. REICH und L. T. SAMUELS, *Science* 111, 578 (1950). – H. REICH, D. H. NELSON und A. ZAFFARONI, *J. Biol. Chem.* 187, 411 (1950).

³ T. REICHSTEIN und J. v. EUW, *Helv. chim. Acta* 21, 1187 (1938). – Käufliche Extrakte für klinische Zwecke enthalten oft kein Cortexon, da dieses im Fabrikationsprozess entfernt wurde. – A. ZAFFARONI und R. B. BURTON, *J. Biol. Chem.* 193, 719 (1951).

⁴ V. HECHTER, A. ZAFFARONI, R. P. JACOBSON, H. LEVY, R. W. JEANLOZ, V. SCHENKER und K. S. PINCUS, *Recent Progress in Hormone Research*, Bd. 6 (Academic Press Inc., New York 1951), S. 215.

¹ J. Chem. Soc., London.

² R. N. CHAKRAVARTI und S. C. CHAKRAVARTI, *J. Inst. Chemists (India)*, 24, 96 (1952).

enthaltenen Mengen sind aber zu klein, um die starke Wirkung solcher Extrakte zu erklären. Ausserdem gelang es schon früh aus Nebennierenextrakten Fraktionen zu bereiten, die sicher kein Cortexon enthielten und je Gewichtseinheit stärker wirksam waren als dieses¹. Die Frage, ob solche Extrakte noch einen neuen unbekannten Stoff mit besonders hoher Aktivität enthalten oder ob die Wirkung durch einen Synergismus zwischen verschiedenen bekannten Stoffen hervorgerufen wird, blieb lange Zeit unentschieden.

Kürzlich ist ein neuer, besonders empfindlicher Test beschrieben worden, der es gestattet, die Änderung im Verhältnis der Na- und K-Ausscheidung im Harn mit sehr kleinen Substanzmengen rasch zu messen². Mit



Abb. 1. Neuer Stoff aus Nebennieren, Hydrat, Krist. aus Azeton-Wasser. Vergrösserung rund 50fach. (Wir danken Herrn H. DÜRR für diese Aufnahme.)

Hilfe dieses Tests gelang es, eindeutig zu zeigen, dass Nebennierenextrakte tatsächlich einen definierten Stoff mit sehr hoher Aktivität enthalten, der sich papierchromatographisch genau nachweisen liess³ und auch im Blut vorkommt⁴. Es gelang auch, diesen Stoff sehr weitgehend zu reinigen⁵. Die besten Konzentrate waren im genannten Test etwa 60–80mal stärker wirksam als Cortexon.

Wir haben den Stoff jetzt aus mehreren parallel von unsern beiden Arbeitsgruppen in Basel bearbeiteten Konzentraten präparativ in reiner kristallisierter Form isolieren können. Als Ausgangsmaterial dienen nach der Methode von CARTLAND und KUIZENGA⁶ bereitete Extrakte. Für den Hauptversuch wurde ein solcher Extrakt aus 500 kg Rindernebennieren verwendet, wobei die Originalvorschrift aber nur bis zum Ausschütteln mit Äthylendichlorid verfolgt wurde. Das so erhaltene Material (167 g)¹ wurde durch Verteilung

zwischen 30%igem Methanol und Petroläther gereinigt². Aus der methanolisch-wässrigen Phase wurde es nach Entfernung des Methanols mit Chloroform-Äther (1:3) ausgeschüttelt und mit verdünnter HCl und KHCO_3 -Lösung gewaschen. Das so gereinigte Konzentrat (27 g) wurde zuerst auf einer grossen Säule durch Verteilungschromatographie³ in 140 Fraktionen zerlegt. Ausser vielen der bekannten Corticoide isolierten wir dabei auch einige neue Stoffe. Der gesuchte Stoff liess sich durch Papierchromatographie⁴ in den Fraktionen 85–91 lokalisieren, wobei Nr. 85 nur Spuren enthielt. Das verbleibende Material der vereinigten Fraktionen 86–91

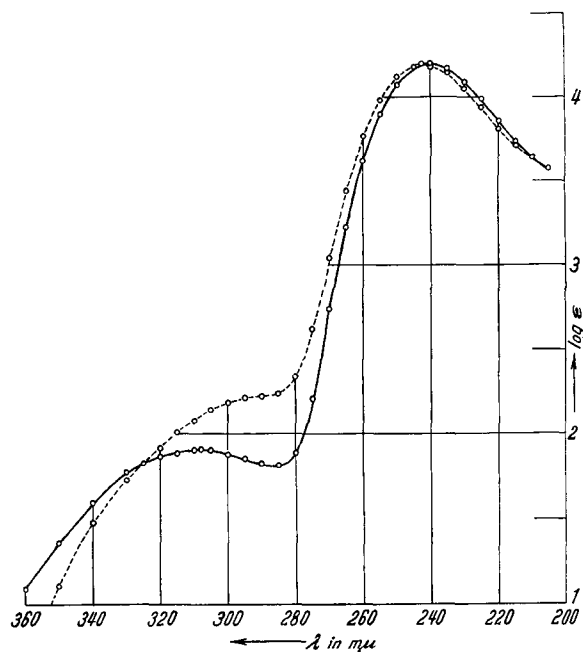


Abb. 2. Ultraviolett-Absorptionsspektren in Alkohol (aufgenommen von Herrn Dr. P. ZOLLER in einem «Unicam-Quartz-Spectrophotometer SP. 500»).

○—○ Neuer Stoff aus Nebennieren: Maxima bei $240,0 \pm 0,25 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,20$; $308,0 \pm 2 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 1,92$; $c = 9,70 \cdot 10^{-4}$, 10^{-5} und $10^{-6} \text{ Mol je Liter}$.

○—○ 17-Oxycorticosteron (zum Vergleich): Maximum bei $242,5 \pm 0,25 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,20$, Inflexion bei etwa $295 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon =$ etwa 2,22; $c = 2,61 \cdot 10^{-3}$, 10^{-4} und $10^{-5} \text{ Mol je Liter}$.

(324 mg) wurde durch nochmalige Verteilungschromatographie auf einer kleinen Säule mit gereinigter Zellulose als Träger unter Verwendung des B_2 -Systems von BUSH¹ erneut in 57 Fraktionen zerlegt. Zwei kristalline Neben-

¹ J. J. PFIFFNER, O. WINTERSTEINER und H. M. VARS, *J. Biol. Chem.* **111**, 585 (1935). – O. WINTERSTEINER und J. J. PFIFFNER, *J. Biol. Chem.* **116**, 291 (1936). – H. L. MASON, *Endocrinology* **25**, 405 (1939). – E. C. KENDALL, *J. Amer. Med. Assoc.* **116**, 2394 (1941).

² S. A. SIMPSON und J. F. TAIT, *Endocrinology* **50**, 150 (1952).

³ J. F. TAIT, S. A. SIMPSON und H. M. GRUNDY, *Lancet* **262**, 122 (1952). – H. M. GRUNDY, S. A. SIMPSON und J. F. TAIT, *Nature* **169**, 795 (1952). – H. M. GRUNDY, S. A. SIMPSON, J. F. TAIT und W. WOODFORD, *Acta endocrinol.* **11**, 199 (1952).

⁴ S. A. SIMPSON, J. F. TAIT und I. E. BUSH, *Lancet* **263**, 226 (1952).

⁵ S. A. SIMPSON und J. F. TAIT, *Memoirs of the Society for Endocrinology*, Memoir Nr. 2 (im Druck).

⁶ G. F. CARTLAND und M. H. KUIZENGA, *J. Biol. Chem.* **116**, 57 (1936).

¹ Dieses Gewicht ist viel höher als dasjenige, das CARTLAND und KUIZENGA für diese Stufe angeben. Gewichte von solchen Rohfraktionen schwanken aber stark je nach Qualität des Drüsenmaterials.

² T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **19**, 1107 (1936).

³ Es wurde genau das von H. HEGEDÜS, CH. TAMM und T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **36**, 357 (1953), beschriebene Ausführungsverfahren benutzt, unter Verwendung von Säule Nr. 4 mit gereinigtem Kieselgur als Träger, Wasser als stationärer Phase und Petroläther-Benzol, dann reinem Benzol als mobiler Phase. Dauer insgesamt 70 Tage. Diese Säule gibt praktisch keinen Blindwert; die Trennung ist ausgezeichnet.

⁴ Als Kriterium für die Identifizierung dienten: die Wanderungsgeschwindigkeiten im System Propylenglycol-Toluol [A. ZAFFARONI, R. B. BURTON und E. H. KEUTMANN, *Science* **111**, 6 (1950); *J. Biol. Chem.* **188**, 763 (1951)] sowie in den Systemen B_5 und C von BUSH⁵, das Reduktionsvermögen, die UV-Absorption, die gelbe Fluoreszenz mit wässrig-methanolischer NaOH und das Ausbleiben von Farbreaktion mit H_3PO_4 und SbCl_5 [R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **34**, 2278 (1951)].

produkte wurden erhalten. Der gesuchte Stoff befand sich zur Hauptsache in den Fraktionen 32–39, die aus Azeton–Äther kristallisierten; Spuren liessen sich noch in den Fraktionen 31 und 40 nachweisen. Die Ausbeute an Rohkristallen betrug 22 mg. Umkristallisieren lieferte 21,2 mg farbloses, einheitliches, aschefreies Material. Aus Azeton–Wasser wurden besonders gut ausgebildete Kristalle erhalten (vgl. Abb. 1). Die lufttrockenen Kristalle enthielten Kristallwasser, denn bei längerem Trocknen bei 0,01 Torr und 50° über P_2O_5 wurde 1 Mol H_2O abgegeben. Das Hydrat schmolz auf dem Kofler-Block je nach Kristall-grösse und Erhitzungsgeschwindigkeit im Bereich zwischen 104 und 112° innerhalb etwa 3°. Die Masse kristallisierte bei weiterem langsamem Erwärmen wieder vollständig und schmolz dann bei etwa 153–158° definitiv. (Die letzten Spuren verschwanden oft erst bei rund 165°). Die spezifische Drehung des Hydrats betrug $[\alpha]_D^{25} = +145^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,9896$ in Azeton), das UV.-Absorptionsspektrum (vgl. Abb. 2) zeigte die für α, β -ungesättigte Ketone typische Bande.

Die beschriebene Verbindung war im Test nach SIMPSON und TAIT² rund 100mal und in dem von DESAULLES und SCHULER modifizierten Natriumretentionstest nach KAGAWA *et al.*³ etwa 50mal stärker wirksam als Cortexon. Im Erhaltungstest am nebennierenlosen Hund erwies sie sich als mindestens 30mal wirksamer als Cortexon-azetat⁴. Die Ergebnisse der beiden zuletzt erwähnten Versuchsanordnungen sprechen dafür, dass sich die Wirkungen der Verbindung auch in qualitativer Hinsicht von denjenigen des Cortexon unterscheiden. Wir glauben daher, dass ein neues wichtiges Hormon der Nebennierenrinde vorliegt. Über die Versuche zur Konstitutionsermittlung und Synthese wird später berichtet, ebenso über eingehendere biologische Versuche. Wir behalten uns vor, für die Verbindung dann einen neuen Trivialnamen vorzuschlagen.

Wir danken Herrn Prof. E. C. DODDS aufrichtig für sein Interesse an dieser Arbeit und die Förderung des Kontaktes zwischen den Arbeitsgruppen in London und in Basel. Der N. V. Organon Oss, Holland, danken wir auch hier bestens für die Überlassung von Nebennierenextrakten.

S. A. SIMPSON, J. F. TAIT,
A. WETTSTEIN, R. NEHER,
J. v. EUW und T. REICHSTEIN.

*The Middlesex Hospital Medical School, London W. 1;
Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel,
Pharmazeutische Abteilung, und Organisch-Chemische
Anstalt der Universität Basel, den 23. Juli 1953.*

¹ I. E. BUSH, *Biochem. J.* **50**, 370 (1952). – Diese Säule mussten wir sehr gründlich vorreinigen und die Lösungsmittel jeden Tag frisch destillieren, trotzdem verblieb ein merklicher Blindwert (Autoxydation des Toluols?).

² S. A. SIMPSON und J. F. TAIT, *Endocrinology* **50**, 150 (1952).

³ C. M. KAGAWA, E. G. SHIPLEY und R. K. MEYER, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 281 (1952). Wir danken den Herren Dr. P. DESAULLES und Prof. W. SCHULER auch hier bestens für die Ausführung dieser Bestimmung, bei der zusätzlich die Wasserretention sowie die Veränderung der Kaliumausscheidung gemessen wurde⁵.

⁴ G. A. HARROP, J. J. PFIFFNER, A. WEINSTEIN und W. W. SWINGLE, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **29**, 449 (1932). – J. J. PFIFFNER, W. W. SWINGLE und H. M. VARS, *J. Biol. Chem.* **104**, 701 (1934). – R. MEIER, H. GYSEL und R. MÜLLER, *Schweiz. Med. Wschr.* **74**, 93 (1944). – F. GROSS und R. MEIER, *Schweiz. Med. Wschr.* **81**, 1013 (1951). – Herrn Dr. F. GROSS sei auch hier bestens für diese Bestimmung gedankt⁵.

⁵ Die genannten Herren werden über ihre Versuche an anderer Stelle ausführlicher berichten.

Summary

A new crystalline compound has been isolated from beef adrenal extracts. In three different assay methods using epinephrectomised rats or dogs it was found to be from 30 to 100 times as potent as cortexone (11-deoxycorticosterone) or its acetate.

The Gram-Staining Behavior of Spermatozoa

One of the earliest observations on the gram-staining of spermatozoa was made by ERNST¹ who noticed that the heads of spermatozoa stain grampositively. Five decades later, in 1944, HOTCHKISS² recommends "that the smear be flamed" prior to the use of gram-stain. Then he adds, "some of the spermatozoa take the gram-positive and some the gram-negative reaction". Finally, he says "the interpretation of this reaction is unknown to the author". This inconclusiveness led us to re-examine the gram-staining behavior of spermatozoa.

Materials and Methods

Smears.—Samples of human semen 15 min old and thus liquefied³ were used, and the smears made according to the method of HOTCHKISS².

Fixation.—Either air drying, flame fixation or an immersion for 2 min in a mixture of formalin⁴ and ethyl alcohol (95%) 1:9 was used. After fixation by any of these methods the slides were kept in ethyl alcohol (80%) prior to staining. (The immersion in 80% ethyl alcohol should not exceed 1 or 2 h).

Gram-Stain.—This was made up according to ROULET⁵. The "mordant" was prepared by dissolving 1 g iodine⁶ in 100 ml of ethyl alcohol (80%). As decolorizer ethyl alcohol (95%) was used.

Gram-Staining Procedure.—The slides kept in ethyl alcohol (80%) were transferred for a few seconds to a 70% ethyl alcohol solution, then to one of 50% concentration, and finally to tap water. They were then immersed in the gentian violet solution for 2 min. After rinsing three times in tap water (fresh changes each time) the slides were immersed for one second in ethyl alcohol (50%) and then in the "mordant" for 30 s. After rinsing by 1 s immersions successively in 3 COPLIN jars containing ethyl alcohol (80%), the slides were kept 2 min in ethyl alcohol (95%) in order to be decolorized and then rinsed in absolute alcohol for a few seconds and dried before proceeding with microscopic examination.

Other Treatments Prior to Gram-Staining.—Fixed slides were rinsed successively in 80%, 70%, 50% alcohol, then in tap water for a few seconds and finally, kept in 0.5% aqueous picric acid solution for 20 h at room temperature. Some of these slides were treated with GRAM's gentian violet solution for 23 h. Control slides were kept in alcohol (80%) during the time of treatment, i.e., after fixation and prior to the application of gram-stain.

¹ P. ERNST, *Arch. mikroskop. Anat.* **47**, 669 (1896).

² R. S. HOTCHKISS, *Fertility in Man* (Lippincott, Philadelphia, 1944).

³ J. MACLEOD, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **54**, 796 (1952).

⁴ From Ingram & Bell Ltd: pH = 4.5; strength = 39 to 40%.

⁵ F. ROULET, *Methoden der pathologischen Histologie* (Springer, Wien 1948), p. 480. – With gentian violet of the Ciba Company Ltd.

⁶ There is no reason to add potassium iodide since iodine is quite soluble in ethyl alcohol (80%) without the presence of KI. An aqueous solution of iodine is impractical for several reasons: KI must be present to render the iodine soluble, the watery solution causes a dissociation of tissues and the penetration of iodine into the tissues is slower.