

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Rauwolfia Alkaloids, XI¹,

Isolation of an Isomer of Yohimbine

Further investigations of the alkaloids of *Rauwolfia serpentina* Benth. have resulted in the isolation of another isomer of yohimbine². This base was obtained from ajmaline mother liquors (solution A)³. Purification of the crude alkaloid was accomplished by chromatography and crystallization from methanol-water. The base could be obtained in either of two crystalline forms melting at 125–128° and 181–183°. The infrared spectra (in chloroform) were identical and also $[\alpha]_D^{26}$ –96° (in pyridine) was the same for both forms. Analyses of the two forms were identical and indicated an empirical formula of $C_{21}H_{26}O_3N_2$. (Calculated: C, 71.16; H, 7.39; N, 7.90; OCH_3 , 8.75. Found for low melting form: C, 70.94; H, 7.39; N, 7.96; OCH_3 , 8.51. Found for high melting form: C, 71.06; H, 7.65; N, 7.77). The following infrared bands were observed (Nujol): inflection at 3527 cm^{-1} (OH); bands at 3365 (NH), 1720 (CH_3OOC-), and 738 (ortho-disubstituted benzene ring). Ultraviolet spectrum (ethanol): maxima (in $m\mu$) at 226 (34240), 282 (7760), and 290 (6730); minima at 248 (2300) and 288 (6520).

The following derivatives have been prepared and their analytical values support the above empirical formula: hydrochloride, m.p. 235–240° (decomp.), $[\alpha]_D^{26}$ –75°; methiodide, m.p. 233–236° (decomp.); monoacetate, m.p. 180–181° (containing half a mole of benzene of crystallization), $[\alpha]_D^{26}$ –124°; diacetate, m.p. 193–195°, $[\alpha]_D^{26}$ –102°; benzoate, m.p. 230–231°; benzoate hydrochloride, m.p. 246–248°; hydrazide, m.p. 288–295°, $[\alpha]_D^{26}$ –93° (all rotations in pyridine except the base hydrochloride in water).

Alkaline saponification yielded the corresponding acid, isolated as the hydrochloride, m.p. 258°, $[\alpha]_D^{26}$ –98° (in water). Esterification with diazomethane reformed the starting material. OPPENAUER oxidation with aluminium phenoxide yielded a ketone, m.p. 247–250°, $[\alpha]_D^{26}$ +163° (pyridine). (Calculated for $C_{19}H_{20}ON_2$: C, 77.51; H, 7.53. Found: C, 77.71; H, 7.63). Infrared spectrum (Nujol): bands at 3356 cm^{-1} (NH), 1701 (CO), and 742 (ortho-disubstituted benzene ring).

The higher melting form of this yohimbine isomer, its hydrochloride, and methiodide agree in melting point with the published values of ajmalinine and its corresponding derivatives⁴. Although the rotations of the hydrochlorides differ by 31°, the rotations of the free bases are identical.

The reported ajmalinine formula ($C_{22}H_{26}O_3N_2$) differs from the yohimbine formula by one C-atom. Further investigations of this alkaloid⁵ are in progress.

F. E. BADER, D. F. DICKEL,
R. A. LUCAS, and E. SCHLITTLER

Research Department, Ciba Pharmaceutical Products, Inc., Summit, N. J., April 21, 1954.

¹ Communication X, E. SCHLITTLER *et al.*, Exper. 10, 133 (1954).

² A. HOFMANN, Helv. chim. Acta 37, 314 (1954). - F. E. BADER *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 76, 1695 (1954).

³ L. DORFMAN *et al.*, Helv. chim. Acta 37, 59 (1954).

⁴ S. SIDDIQUI and R. H. SIDDIQUI, J. Indian chem. Soc. 12, 37 (1935).

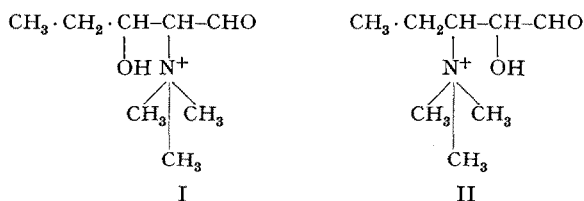
⁵ Designated as alkaloid 3078.

Zusammenfassung

Aus Ajmalin-Mutterlaugen von *Rauwolfia serpentina* Benth. ist ein weiteres Isomeres des Yohimbins isoliert worden. Das Alkaloid besitzt zwei verschiedene Kristallformen, wovon die höher schmelzende in ihren Eigenschaften weitgehend dem Ajmalinin gleicht. Spektren und Derivate werden beschrieben.

Zur Kenntnis des Muscarins

Für Muscarin, den Giftstoff des Fliegenpilzes [*Amanita muscaria* (Lex Fr.) Quél.] stehen seit über 20 Jahren die von KÖGL, DUISBERG und ERXLING¹ aufgestellten Formeln I und II ($C_8H_{18}O_2N^+$) zur Diskussion.



Sie wurden hergeleitet aus der Analyse des Reineckates, der positiven Aldehydreaktion nach SCHIFF und ANGELI-RIMINI und aus dem Hofmannschen Abbau, welcher Trimethylamin und α, β -Dioxyvaleriansäure ($CH_3CH_2CHOH \cdot CHOH \cdot COOH$) ergeben haben soll. Aus verschiedenen Gründen sind diese Formeln angezweifelt worden. Sie konnten auch nicht durch Synthesen bestätigt werden².

Wir haben die Bearbeitung des Muscarins aufgenommen und sind zu teilweise abweichenden Resultaten gekommen, weshalb wir unsere Ergebnisse kurz mitteilen wollen.

Gang der Aufarbeitung: frische Pilze wurden unter Alkohol rasch fein zerkhackt und die Alkoholextrakte im Vakuum (Dünnschichteneindampfer) konzentriert. Den wässrigen Sirup trennten wir in alkohol-leichtlösliche und -schwerlösliche Teile. Die biologische Aktivität befand sich im leichtlöslichen Teil. Nach Konzentrieren und Entfetten ergab sich ein wässriges Konzentrat, woraus Muscarin mit einem Gemenge inaktiver Basen als Reineckat abgeschieden wurde. Nach dessen Überführung in die Chloride wurde an Cellulosekolonnen mit Butanol-Pyridin-Wasser- und Butanol-Ammoniak-Wasser-Gemischen aufgetrennt. Alle Stufen und Fraktionen wurden pharmakologisch und später papierchromatographisch kontrolliert. Aus den weitgehend reinen und völlig cholinfreien Konzentraten kristallisierten wir das Muscarin als Tetrachloraurat. Nach dessen Umwandlung ins Chlorid liess sich dieses aus Isopropanol-Aceton erstmals kristallisieren (siehe Abb. 1). Ausbeute 70% der

¹ F. KÖGL, H. DUISBERG und H. ERXLING, Liebigs Ann. Chem. 489, 156 (1931).

² Siehe zum Beispiel F. KÖGL und H. VELDSTRA, Liebigs Ann. Chem. 552, 1 (1942).

durch pharmakologischen Test im wässrigen Konzentrat festgestellten Menge.

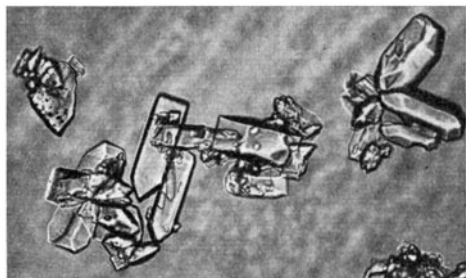


Abb. 1. Muscarinchlorid.

Unsere Analysen passen besser auf $C_9H_{20}O_2N^+$ als auf $C_8H_{18}O_2N^+$.

Chlorid, Smp. 181–182°

$C_9H_{20}O_2N^+Cl^- \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (getr. 20°, 0,001 mm)

berechnet C 49,42 H 9,68 N 6,41 %
gefunden 49,96 9,36 6,18 %

$C_9H_{20}O_2N^+Cl^-$ (getr. 70°, 0,001 mm)

berechnet C 51,54 H 9,62 %
gefunden 51,37 9,89 %

Tetrachloraurat, Smp. 121–121,5°

$C_9H_{20}O_2N^+AuCl_4^-$

berechnet C 21,06 H 3,93 N 2,73 Au 38,42 %
gefunden 20,81 3,89 2,74 39,13 %

Reinecat, Smp. 181–182° (vak.)

$C_9H_{20}O_2N^+[Cr(SCN)_4(NH_3)_2]^-$

berechnet C 31,69 H 5,32 N 19,90 %
gefunden 32,31 5,47 20,12 %

$[\alpha]_D^{20} + 6,7^\circ$ (Wasser).

KÖGL *et al.* gaben $[\alpha]_D^{20} + 1,57^\circ$ (Wasser).

Reines Muscarinchlorid gibt keine Aldehydreaktionen nach SCHIFF und ANGELI-RIMINI; es reagiert nicht mit Dinitrophenylhydrazin in 2*n* HCl; die einer Carbonylgruppe entsprechenden Absorptionsbanden fehlen im UV. und IR.; Natriumborhydrid in Methanol und Platin-Wasserstoff in Äthanol lassen Muscarin unverändert; Silberdiamin in verdünntem Ammoniak wird nicht reduziert; somit ist die immer wieder diskutierte Aldehydgruppe im Muscarin nicht vorhanden. Auch das mit verdünnter Salzsäure behandelte Muscarinchlorid gibt keine Aldehydreaktionen, was normale Acetalformeln in Frage stellt. Muscarinhydroxyd ist in siedender, wässriger Lösung weitgehend stabil. Dadurch werden Trialkylalkoxy-Verbindungen¹ ausgeschlossen.

Muscarin ist ein quartäres Alkaloid, wie schon SCHMIEDEBERG und HARNACK² angenommen haben, denn die Pyrolyse ergibt das pharmakologisch kaum aktive Normuscarin [Öl, Sdp. etwa 130° (Badtemperatur) / 0,002 mm, Hydrochlorid, Smp. 144–145°], dessen Quaternisierung wieder zum Muscarinchlorid führt (Smp. Mischmp. R_F -Wert, Chloraurat, pharmakologischer Test).

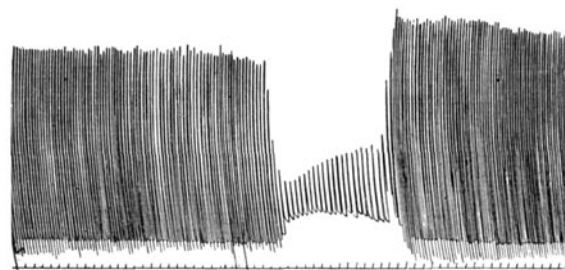
Der Hofmannsche Abbau (Kochen mit Ag_2O) gibt flüchtige Basen, aber nicht Trimethylamin, wie KÖGL *et al.* glaubten nachgewiesen zu haben. Auch mit der KOH-Schmelze konnten wir dieses nicht nachweisen.

Bei der Chromsäureoxydation fanden wir unter den wasserdampfgefährlichen Säuren nur Essigsäure. Propionsäure, welche aus einer α, β -Dioxyvaleriansäure erwartet werden müsste, konnte auch nicht in Spuren festgestellt werden.

Wir möchten betonen, dass durch die pharmakologische Untersuchung die Anwesenheit nur *einer* Base mit Muscarinwirkung festgestellt werden konnte. Unsere von KÖGL *et al.* abweichenden Resultate beruhen eher auf verschiedenem Reinheitsgrad der verwendeten Muscarinpräparate als auf einer grundsätzlichen Verschiedenheit der Giftstoffe. KÖGL hat offenbar nur im Chloraurat ein annähernd reines Muscarinsalz in Händen gehabt, welches er aber wegen der gegenüber dem Reinecat abweichenden Analysenresultate und der geringen Ausbeute als zersetzt betrachtete. Sein Chloraurat schmolz bei 115–117°.

Auch KING³ hatte offensichtlich weitgehend reines Muscarinchloraurat isoliert (gefunden 38,6% Au, daraus Äquivalentgewicht des Chlorids 210). Ferner sprechen für eine Gleichartigkeit der an verschiedenen Orten isolierten Muscarinpräparate die übereinstimmende biologische Wirkung.

Der pharmakologische Nachweis einer Anreicherung bei der Aufarbeitung, die Identifikation in Chromatogrammen und die Aktivitätsbestimmung wurde mit Straubischen Froschherzen (*Rana temporaria*) durchgeführt. Ventrikel und Aortenkanüle enthielten 1 ml der mit Ringerlösung verdünnten Extrakte oder Reinalkaloidlösungen (18°, mit Sauerstoff durchspült).



Muscarin-Cl 0,01 γ; Atropin

Abb. 2. Verkleinerung der Herzamplitude (*Rana temporaria*) und Verlangsamung der Schlagfrequenz durch Muscarin, antagonisiert durch Atropin.

Die durch Muscarin bedingte Verminderung der Hubhöhe und Verlangsamung der Schlagfrequenz des Froschherzens wird durch Atropin in minimaler Konzentration von 10^{-8} aufgehoben (Abb. 2). Nach KÖGL, DUISBERG und ERXLING ist als Muscarineinheit (ME.) diejenige Menge definiert, welche in 1 ml gelöst, die Herzamplitude auf 75% des Ausgangswertes vermindert (Abb. 3). Bei 32–50 g schweren Temporarien entspricht in unseren Versuchen im März–April 1 ME. dem statistisch gesicherten Wert von $0,0042 \pm 0,00032 \gamma$ reines Muscarinchloridhydrat.

1 g Muscarinchlorid enthält demnach $238 \cdot 10^6$ ME. KÖGL *et al.* erhielten mit Esculentenherzen im Februar niedrigere Werte: 1 g ihres Muscarinchlorides entsprach $175 \cdot 10^6$ ME. Beim Frosch mit Thoraxfenster bewirkt 0,3–0,4 mg/kg Muscarinchlorid intralymphal diastolischen Herzstillstand in 4–10 min, der durch 1 Tropfen einer Atropinlösung ($5 \cdot 10^{-6}$) auf das Herz aufgehoben wird. DALE³ brauchte für die gleiche Wirkung bei Escu-

¹ E. F. ROGERS, D. BOVET, V. G. LONGO und G. B. MARINIBETTOLO, Exper. 9, 260 (1953).

² O. SCHMIEDEBERG und E. HARNACK, Arch. exp. Path. Pharm. 6, 101 (1877).

³ F. KÖGL und H. VELDSTRA, Liebigs Ann. Chem. 552, 36 (1942).

² H. KING, J. Chem. Soc. 1922, 1743.

³ H. DALE, J. Pharm. exp. Ther. 6, 147 (1914).

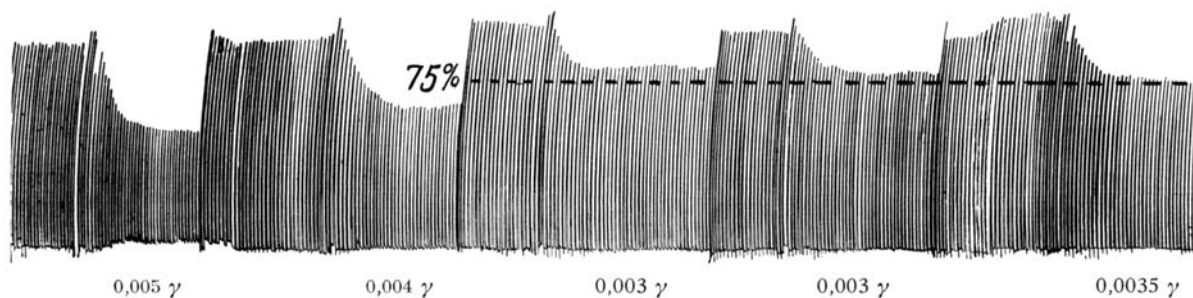


Abb. 3. Quantitative Muscarinbestimmung am Straubischen Froschherzen: 25% Lähmung durch 0,0035 γ Muscarinchlorid (= 1 Muscarineinheit).



Abb. 4. Acetylcholin- (A) und Muscarinchlorid-Wirkungen (M) am Kaninchen- (4a) und Katzendarm (4b).

lenten 0,38 mg/kg, KÖGL ebenfalls bei Esculenten 0,16–0,23 mg/kg.

Der isolierte Kaninchendarm (Ileum) kontrahiert sich bei einer Grenzkonzentration von 10^{-9} . Der Vergleich mit Acetylcholin ergibt eine doppelt so starke Wirkung durch Muscarin auf den Darmtonus des Kaninchens (Abb. 4a), während bei der Katze die Kontraktionen durch Muscarin etwas schwächer als die durch Acetylcholin bewirkten sind (Abb. 4b). KING fand für sein Muscarinchlorid submaximale Kontraktion des Kaninchendarmes mit $6,7 \cdot 10^{-7}$ und einen erkennbaren Effekt mit $6 \cdot 10^{-8}$.

Auch die blutdrucksenkende Wirkung des Muscarinchlorids bei der Katze ist stärker als diejenige des Acetylcholins. Die minimale depressive Dosis beträgt intravenös 0,002 γ /kg (Acetylcholin 0,005 γ /kg). Bei gleichen Mengen wirkt Muscarin etwa doppelt so stark wie Acetylcholin, und die Blutdrucksenkung dauert 2–3mal länger. Die gleiche Blutdrucksenkung tritt auch nach Vagusdurchtrennung auf. Die Atmung wird durch Dosen über 0,02 γ /kg gesteigert: das Atemvolumen ist vergrößert, die Frequenz erhöht. Oberhalb 1 γ /kg wird sie durch Bronchokonstriktion vermindert und steht still nach 10 γ /kg. Atropin hebt diese tödliche Wirkung auf, so dass sich Atmung und Blutdruck innerhalb einiger Minuten beinahe vollständig erholen. Auch durch Muscarin bedingte Miosis und Speichelfluss werden durch Atropin verhindert.

Die Muskelendplatten werden auch bei diesen grossen Muscarinmengen ($> 10 \gamma$ /kg) nicht beeinflusst, wie auch die Überleitung autonomer Synapsen (Ganglion cervicale superius) unverändert bleibt.

Zusammenfassend kann aus diesen Versuchen die reine, periphere, parasympathomimetische Muscarinwirkung folgendermassen charakterisiert werden: Starke Blutdrucksenkung, auch nach Vagektomie. Verlangsamung der Herztätigkeit bis zum diastolischen Stillstand. Beschleunigung der Atmung, Bronchokonstriktion. Erhöhung des Darmtonus. Fehlen von curare- oder nikotinartiger Wirkung. Der Vergleich der Wirkungsstärke

mit früher beschriebenen Muscarinsalzen anderer Autoren zeigt, dass das untersuchte reine Muscarinchlorid meistens stärker wirksam ist.

Die ausführliche Beschreibung dieser Versuche und weitere chemische und pharmakologische Untersuchungen werden an anderen Stellen veröffentlicht.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds und der Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz für die Unterstützung dieser Arbeit.

C. H. EUGSTER und P. G. WASER

Chemisches Institut und Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, den 22. April 1954.

Summary

The alkaloid muscarin was isolated from fly agaric. The analyses of crystallized salts (chloride, tetra-chloroaurate, REINECKE's salt) led to $C_8H_{20}O_2N^+$ as the simplest formula. The presence of aldehyde and tri-methylammonium groups, which had been assumed hitherto, could not be proved. The quaternary nature of the nitrogen atom was shown. Pharmacological tests on frog heart, rabbit gut and cats show the purely peripheral parasympathomimetic effect of the smallest doses.

Über die Molekulargrösse des Hämovanadins¹

(Untersuchungen über den vanadiumhaltigen Blutfarbstoff, III)

Hämovanadin, der von MARTIN HENZE² in *Phallusia mamillata* Cuvier entdeckte, vanadiumhaltige Blutfarb-

¹ Dem Entdecker des Hämovanadins zum 80. Geburtstag gewidmet.

² M. HENZE, Z. physiol. Chem. 72, 494 (1911).