

cases the HFC is elevated in the wound and granulation tissue as compared with the respective controls.

Since human skin mast cells are known to form histamine¹², it was essential to investigate possible changes in the number of mast cells in the tissues under study. The determinations summarized in Table II were done in the laboratory of Dr. H. RORSMAN of the Dermatology Clinic of the University of Lund and show that the number of mast cells in the immediate region of the wound is not higher than at the control sites. It should be mentioned that in the rat the number of mast cells is reported to be decreased in the region of skin wounds in the first 24 h¹³.

Table I. HFC expressed as counts per min per g tissue. In specimens Nos. 1, 3, 4 and 7 tissues from two incisions, in No. 5 from three incisions were pooled. Nos. 1–5 were excised 24 h after wounding, Nos. 6–8 at 48 h

No.	Tissue	HFC	Patient Age	Sex	Diagnosis
1	Skin	30	67	♂	Hyperplas. prostatæ
	Wound tissue	<1	65	♂	Adenocarc. prostatæ
	Granulation tissue	110			
2	Skin	60	69	♂	Cancer prostatæ
	Subcutis	15			
	Wound tissue	40			
	Granulation tissue	60			
3	Skin + Subcutis	<1	62	♀	Cancer ves. urin.
	Wound tissue +	40	69	♂	Hyperplas. prostatæ
	Granulation tissue				
4	Skin	110	45	♂	Fistula urethrae
	Subcutis	35	69	♂	Hyperplas. prostatæ
	Wound tissue	180			
	Granulation tissue	110			
5	Skin	<1	53	♂	Nephrolith. dx.
	Subcutis	10	21	♂	Haemangiom. scrot. dx.
	Wound tissue	<1	72	♂	Papilloma ves. urin.
	Granulation tissue	15			
6	Skin	20	50	♂	Cancer ves. urin.
	Wound tissue +	30			
	Granulation tissue				
7	Skin + Subcutis	110	16	♂	Nephrolith. dx.
	Wound tissue +	160	44	♀	Pyelonephr. chron. ren. dx.
	Granulation tissue				
8	Skin	<1	64	♀	Pyelonephr. chron.
	Subcutis	15			
	Wound tissue	240			
	Granulation tissue	<1			

Alkaloide aus *Schizozygia caffaeoides* (Boj.) Baill.

Die Apocynacee *Schizozygia caffaeoides* (Boj.) Baill., ein in Ostafrika heimischer Strauch, dient in der Volksmedizin Tanganjikas zur Bereitung eines Absudes, der zur Behandlung von Schwindelanfällen Verwendung findet. Inhaltsstoffe dieser Pflanze sind bis jetzt nicht bekannt geworden. Im Rahmen unserer Arbeiten über Apocynaceenalkaloide untersuchten wir im Ulangadistrikt (Tanganjika) gesammelte¹ Wurzeln, Zweige und Blätter von *Schizozygia caffaeoides*² auf ihren Alkaloidgehalt. Aus der von den einzelnen Pflanzenteilen gewonnenen Fraktion der tertiären Basen liess sich durch Kristallisation ein einheitliches Hauptalkaloid abtrennen, das wir Schizozygine nennen. Die Schizozygine-Mutterlaugen wurden durch 20-

Table II. Number of mast cells per unit in tissues of the wound and control sites

Age	Sex	Patient Diagnosis	Wound			Control		
			A	B	C	A	B	C
45	♂	Fistula urethrae	238	713	262	152	262	279
69	♂	Hyperplas. prostatæ	457	812	172	421	795	426
69	♂	Hyperplas. prostatæ	437	1000	156	600	746	254
62	♀	Cancer ves. urin.	388	1279	271	354	853	213
		Mean:	380	951	215	382	664	293

A: Section through total cutis.

B: Section through uppermost dermis.

C: Section through lower dermis.

It thus appears that the elevated HFC found in the present experiments resides in cells other than mast cells. The great range in the HFC of 'normal' skin tissues may in part be due to the fact that the skin specimen excised from the patient is small, particularly so in No. 4, and therefore the control tissues obtained at sites rather near the wound may represent different intermediary states. Whatever the reason for the wide variations, it appears that in man, as previously shown in the rat, elevation of HFC is associated with reparative growth in healing skin wounds.

Zusammenfassung. Wund- und Granulationsgewebe bildet beim Menschen nach Hautschnitt in den ersten Tagen erhebliche Mengen von Histamin durch Dekarboxylierung von Histidin. Diese Fähigkeit zur gesteigerten Histaminbildung kann dabei nicht den Mastzellen zugeschrieben werden.

G. KAHLSON, ELSA ROSENGREN,
and CLAUDIA STEINHARDT

*Institute of Physiology, University of Lund (Sweden),
January 11, 1963.*

¹² S. E. LINDELL, H. RORSMAN, and H. WESTLING, *Acta Dermatoven.* 41, 277 (1961).

¹³ B. WICKMANN, *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 108, 1 (1955).

stufige Craig-Verteilung bei pH 3,4 in vier Fraktionen zerlegt, von denen jede durch Chromatographie an Aluminiumoxyd weiter aufgetrennt wurde. Die physikalischen und analytischen Charakteristika der dabei isolierten Nebenalkaloide sind mit denjenigen des Schizozygins in der Tabelle zusammengefasst.

Die Mehrzahl der *Schizozygia*-Alkaloide sind strukturell offenbar nahe verwandt. Mit Ausnahme von Schizophyllin und Tabernoschizin besitzen sie die für N-Acyl-indolin-

¹ Herrn Apotheker F. HAERDI danken wir bestens für das Sammeln des Pflanzenmaterials.

² Die botanische Identität wurde am East African Herbarium, Nairobi, unter der Leitung von Dr. VERDECOURT geprüft und bestätigt.

derivate charakteristischen UV-Spektren³ und die einer tertiären Amidgruppierung entsprechende IR-Bande im Bereich von 5,9–6,1 μ . Durch alkalische Verseifung der Amidgruppierung entstehen aus Schizozysin und iso-Schizogamin Aminosäuren, die in saurem Milieu leicht die Alkaloide zurückbilden. Die Amidgruppierung ist daher mindestens bei diesen beiden Alkaloiden Teil eines Lactamringes.

Die UV-Spektren von Schizozysin, α - und β -Schizozynol, Schizolutein und Caffaeoschizin sind einander sehr ähnlich; eine gewisse Ähnlichkeit der Spektren mit demjenigen des Brucins³ deutet darauf hin, dass in diesen Alkaloiden der N-Acy lindolinchromophor in 5,6-Stellung durch Alkoxygruppen substituiert ist. Für Schizozysin und α -Schizozynol konnte dementsprechend die Teilstruktur des 5,6-Methylenedioxy-N-acy lindolins durch die Protonenresonanzspektren⁴ gesichert werden, in denen die $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ Gruppierung durch ein Singulett bei $\tau = 4,08$ und die zwei nicht miteinander koppelnden aromatischen Protonen in 4- und 7-Stellung des Indolinsystems durch Singulette bei $\tau = 2,32$ und $3,37$ in Erscheinung treten. Zusätzlich wurde bei Schizozysin die Methylenedioxygruppe auch durch Farbreaktion mit Gallussäure-Schwefelsäure (Labat-Test) nachgewiesen. Bis jetzt waren in der Indolreihe keine Alkaloide dieses Substitutionstypus bekannt. α - und β -Schizozynol, Schizolutein und Caffaeoschizin⁵ unterscheiden sich von Schizozysin formal durch zusätzliche Sauerstofffunktionen, die durch die IR-Spektren bei α - und β -Schizozynol als Hydroxylgruppen gekennzeichnet sind, während im IR-Spektrum des Schizoluteins⁶ eine zweite Carbonylbande (vermutlich Keton) bei 5,87 μ sowie eine Hydroxylbande bei 2,83 μ auftreten.

Auch Schizogalin und Schizogamin scheinen dem Schizozysin nahe verwandt zu sein, wie man auf Grund von Ähnlichkeiten der IR-Spektren, der optischen Drehung

und der pK-Werte vermuten kann. Sie unterscheiden sich von Schizozysin offenbar hinsichtlich der Substitution am Benzolring des Indolinsystems, wobei auf Grund der UV-Spektren und der OCH_3 -Bestimmung dem Schizogalin das chromophore System des Strychnospermins³ (6-Methoxy-N-acy lindolin), dem Schizogamin dasjenige des Brucins³ (5,6-Dimethoxy-N-acy lindolin) zuzuordnen ist. Das Protonenresonanzspektrum⁴ des Schizogalins bestätigt den aus dem UV-Spektrum abgeleiteten Substitutionstypus (ABX-Spektrum der aromatischen Protonen mit $\tau_X = 2,29$, $\tau_A = 3,38$, $\tau_B = 2,95$; $J_{AB} = 8$ cps, $J_{AX} = 3$ cps, $J_{BX} = 0$ cps; Singulett der OCH_3 -Gruppe bei $\tau = 6,20$). Im übrigen ist das Spektrum demjenigen des Schizozysins sehr ähnlich, so dass man vermuten kann, dass es sich um Substitutionsanaloge desselben Strukturtypus handelt.

Isomer zu den beiden letztgenannten Methoxyindolinderivaten sind iso-Schizogalin und iso-Schizogamin, die sich durch ihre stark negative Drehung, etwas höheren pK-Wert und kürzerwellige Lage der Amidcarbonylbande im IR-Spektrum von den Alkaloiden der Schizozysin-

³ Vgl. N. NEUSS, *Physical Data of Indole and Dihydroindole Alkaloids*, 5th ed. (Lilly Research Laboratories, Indianapolis, Indiana, Nov. 1961).

⁴ Aufgenommen bei 60 MHz (Varian A 60-Spektrometer), CDCl_3 ($c = 10\%$), innerer Standard Tetramethylsilan ($\tau_{\text{TMS}} = 10,00$).

⁵ Nach Mitteilung von Prof. K. BIEMANN, Massachusetts Institute of Technology, enthält Caffaeoschizin (massenspektrometrisch bestimmtes Molgewicht 334) eine zweite Komponente vom Molgewicht 320, vermutlich ein Substitutionsanaloges mit einer $-\text{OCH}_3$ -Gruppe anstelle der $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ Gruppierung. Wir danken Prof. BIEMANN für die Aufnahme der Massenspektren und die Mitteilung seiner Ergebnisse.

⁶ Das massenspektrometrisch (vgl. ⁵) bestimmte Molekulargewicht des Schizoluteins beträgt 366.

Alkaloid	Smp. °C ^a	[α] _D ^b	pK ^{*MCS} ^c	UV-Spektrum ^d		Charakteristische IR-Banden [μ] ^e	Summenformel ^f	Gruppen-Analysen		
				λ _{max}	log ε			OCH ₃	NCH ₃	C-CH ₃
Schizozysin	192–94	+15,5° (I)	4,29	269 313	3,99 3,97	6,05 (C = O)	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃	0	0	0
α-Schizozynol	210–11	+51,3° (II)	4,80	267 313	4,01 3,97	2,96 (OH) 6,11 (C = O) [Nujol]	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₄	0	0	0
β-Schizozynol	247–50	—	4,47	267 313	4,00 3,96	2,78 (OH) [CH ₂ Cl ₂ , c = 0,03] 6,11 (C = O) [KBr]	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₄	—	—	—
Schizolutein	210–12	—	2,5–3	231 272 317	4,24 3,89 3,95	2,83 (OH) 5,87 (C = O, Keton) 6,02 (C = O, Amid)	—	—	—	—
Caffaeoschizin	208–12	+25,6° (II)	4,10	264 307	3,96 3,83	6,03 (C = O) [KBr]	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄ (?)	0	0	0
Schizogalin	156–57	+28,8° (III)	4,32	219 255 295 sh300	4,32 3,97 3,86 3,85	6,04 (C = O)	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	1	0	0
Schizogamin	123–25	–7,9° (III)	4,35	264 302	4,09 4,00	6,07 (C = O)	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	2	0	0
iso-Schizogalin	110–12	–262,3° (III)	4,56	217 250 286 293	4,47 4,02 3,67 3,67	5,89 (C = O)	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	1	0	0
iso-Schizogamin	184–85	–239° (III)	4,58	259 290	4,12 3,87	5,93 (C = O)	C ₂₁ H ₂₁ N ₂ O ₃	2	0	0
Schizophyllin	129–30	–64,0° (II)	6,13	251 299	3,89 3,61	2,94 (NH); 5,78 (C = O)	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	2	0	0
Tabernoschizin	198–99	–138,2° (III)	7,26	303	4,26	2,91 (NH, Indol) 6,10 (C = C) [KBr]	C ₁₈ H ₂₀ N ₂	0	0	1

^a auf dem Koflerblock bestimmt; ^b in Chloroform, $c = 1$, bei 23°C (I), 24°C (II) bzw. 25°C (III); ^c in 80% Methylcellosolve, nach W. SIMON, *Helv. chim. Acta* 41, 1835 (1958); ^d in Methanol; ^e wo nichts anderes vermerkt, in CH_2Cl_2 ($c = 5\%$); ^f die angegebenen Formeln sind analytisch gesichert.

gruppe unterscheiden. Der Substitutionstypus dieser beiden Alkaloide entspricht auf Grund der UV- und Protonenresonanzspektren demjenigen von Schizogalin bzw. Schizogamin, wobei Unterschiede in der Lage und Extinktion der UV-Maxima auf eine Behinderung der Konjugation bei den Alkaloiden der iso-Reihe hindeuten.

Im Gegensatz zu den bis jetzt erwähnten Alkaloiden ist das nur in den Blättern vorkommende Schizophyllin ein am N(a) unsubstituiertes Methoxy-indolinderivat, dessen IR-Spektrum statt einer Amid- eine Estercarbonylbande bei 5,78 μ enthält.

Tabernoschizin nimmt als sauerstofffreies Indolderivat im Rahmen der übrigen *Schizogygia*-Alkaloide eine Sonderstellung ein. Wie der Name andeuten soll, kommt dieses Alkaloid als Spurenalkaloid auch in Apocynaceen des Subtribus *Tabernaemontaninae* vor. Es erwies sich nämlich als identisch mit dem von uns früher aus *Conopharyngia durissima* isolierten Alkaloid E⁷ und wurde inzwischen von uns auch in Blättern von *Conopharyngia holstii* aufgefunden. Summenformel und UV-Spektrum dieses Alkaloids könnten eine Beziehung zu Ulein⁸ vermuten lassen. Im Gegensatz dazu enthält Tabernoschizin jedoch keine

N-Methylgruppe und liefert beim Hofmannabbau kein Carbazolderivat.

Summary. From *Schizogygia caffaeoides* (Boj.) Baill. (Apocynaceae), one major and ten minor new alkaloids have been isolated and characterised. Most of them are N-acylindoline derivatives, partly with the hitherto unknown 5,6-methylenedioxyindoline system. Some possible correlations between these alkaloids are discussed.

U. RENNER und P. KERNWEISZ⁹

Forschungslaboratorien der J. R. Geigy AG, Basel (Schweiz), 6. Februar 1963.

⁷ U. RENNER, D. A. PRINS und W. G. STOLL, *Helv. chim. Acta* **42**, 1572 (1959).

⁸ G. BÜCHI und E. W. WARNHOFF, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 4434 (1959).

⁹ Den Herren Dres. H. FRITZ, R. W. SCHMID und H. WAGNER und ihren Mitarbeitern danken wir für Spektren und Mikroanalysen.

Infective 'Ribonucleic Acid' Extraction from Poliovirus by Sodium Dodecylsulfate

Recently¹ it has been shown that heat, in presence of sodium dodecylsulfate (SDS), releases infective nucleic acid from foot and mouth disease virus. In order to establish whether this treatment could be applied to other RNA viruses, we tested it on a strain of type 1 polio virus.

Methods and Materials. HeLa cell cultures, at complete confluence (10⁶ cells), maintained in a serum-free lactalbumine hydrolysate medium (0.5%) were infected with 10⁸ cytopathic units (CPU) of polio 1 (Brunenders).

Treatment of polio 1 cultures after their cryolysis	CPE on HeLa cells	Minimum of suspended and infected cells necessary for transmission of CPE to HeLa cultures
65°C	—	> 50,000
75°C	—	> 50,000
85°C	—	> 50,000
90°C	—	> 50,000
100°C	—	> 50,000
65°C + SDS	+	1,843
75°C + SDS	+	1,843
85°C + SDS	+	5,530
90°C + SDS	+	5,530
100°C + SDS	—	> 50,000
65°C + SDS + RNase	—	> 50,000
75°C + SDS + RNase	—	> 50,000
85°C + SDS + RNase	—	> 50,000
90°C + SDS + RNase	—	> 50,000
100°C + SDS + RNase	—	> 50,000

The RNA nature of the infection was demonstrated with controls in which the viral extracts were treated at 20°C for 15 min with 0.5 γ /ml γ mol of RNase before the addition to the cell sediments (for more details see the previous papers¹⁻³).

After 12 h at 37°C from the infection, when the cells were completely destroyed, the cultures were frozen at -30°C and thawed at +20°C and then heated for 5 min at various temperatures in a medium containing, or not, 0.1% SDS and finally stored for less than 20 min at -30°C.

The infectivity of the extracted RNA was evaluated according to our modification² of the ELLEM and COLTER's method³: viral extracts were diluted 1/30 in a 0.8M NaCl; 0.2 ml of this solution was added to a sediment of 200,000 HeLa cells, obtained from 2 days' stationary cultures trypsinized, washed in 0.85% NaCl and centrifuged.

After 15 min at 35°C (with continuous shaking), 1 ml of growth medium (Hank's balanced solution containing lactalbumine hydrolysate 0.5% and calf serum 5%) was added to the cells and the suspension so obtained was added to 2 days' HeLa cell cultures (kept at 37°C in tubes).

The cytopathic effect (CPE) was controlled every 24 h for 5 days at 35°C.

Results. The Table shows the infectivity of cultures infected with Polio 1, after cryolysis and heating at various temperatures in presence or not of 0.1% of SDS.

The cultures heated at 65°C to 90°C in presence of SDS are infective for HeLa cells; this infectivity is destroyed by RNase.

Heating in absence of SDS destroys the infectivity.

Riassunto. Il dodecilsolfato di Sodio (SDS) si è dimostrato capace di estrarre, se fatte o agire a temperature di 65°-90°C, acido ribonucleico infettivo da culture di cellule HeLa infettate con estratte da inocula massivi di poliovirus 1.

B. LODDO, B. SCARPA, and S. MUNTONI

Istituto d'Igiene, Università di Cagliari (Italy), January 8, 1963.

¹ H. L. BACHRACH, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **107**, 610 (1961).

² S. MUNTONI, G. BROZZU, and B. LODDO, *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, in press (1963).

³ K. AO. ELLEM and J. S. COLTER, *Virology* **15**, 113 (1961).