unserem synthetischen ^{14}C-Produkt scheint das aber nicht der Fall zu sein. Nach *Langdon & Bloch*[1]) wird mit ^{14}C markiertes natürliches Squalen, das biologisch aus ^{14}C-haltigem Acetat dargestellt wurde, in der Maus weitgehend in ^{14}C-haltiges Cholesterol übergeführt; dies konnte noch mit nur 20800 c.p.m.[2]) lieferndem Squalen nachgewiesen werden. Unser synthetisches „Squalen" erwies sich in vivo und in vitro biologisch vollständig inaktiv[3]), und weil ein bis 750000 c.p.m. lieferndes Produkt verwendet wurde, glauben wir, dass darin weniger als 3% der Molekeln die natürliche Konfiguration besitzen, sofern die Molekeln mit unnatürlicher Konfiguration nicht die Bildung von Cholesterol aus natürlichem Squalen verhindern. Diese Blockierwirkung scheint aber unwahrscheinlich, weil regeneriertes „Squalen" die Synthese von Cholesterol aus markiertem Acetat offenbar nicht beeinflusst[4]).

Wir danken Herrn Dr. *A. Rheiner* für seine Hilfe bei der Übersetzung des Manuskripts.

Chemical Laboratory, University of California,
Berkeley 4, California.

---

91. Über Protoveratrin A und Protoveratrin B.

6. Mitteilung über Veratrum-Alkaloide[5])

von **A. Stoll und E. Seebeck.**

(31. III. 53.)

Gegen Ende des letzten Jahrhunderts konnte *Salzberger*[6]) aus den Rhizomen von Veratrum album erstmals ein stark toxisches Alkaloid isolieren, das er wegen der vermuteten Verwandtschaft mit Veratrin Protoveratrin nannte. Mit der Reindarstellung des Protoveratrins aus den Rhizomen von Veratrum album befassten sich im Laufe der Zeit *Bredemann*[7]), *Poethke*[8]), *Jacobs*[9]) und *Glen*[10]). Aus den Wurzeln von Veratrum viride konnte vor kurzem *Klohs*[11]) ein rohes Protoveratrin gewinnen, das er mit Hilfe der Gegenstromverteilung zwischen Benzol und Acetat-Puffer pH 5,5 in die beiden Alkaloide Protoveratrin und Neoprotoveratrin zerlegte. *Klohs* gibt für das Protoveratrin den Smp.

---

[1]) *R. G. Langdon & K. Bloch*, J. Biol. Chem. **200**, 135 (1953).

[2]) Counts per minute.

[3]) *G. M. Tomkins, I. L. Chaikoff, W. G. Dauben, H. L. Bradlow & P. A. Srere*, Am. Soc. **74**, 6145 (1952).

[4]) *G. M. Tomkins, W. G. Dauben, H. Sheppard & I. L. Chaikoff*, J. Biol. Chem. (im Druck).

[5]) 5. Mitteilung: *A. Stoll & E. Seebeck*, Helv. **36**, 189 (1953).

[6]) *G. Salzberger*, Arch. Pharm. **228**, 462 (1890).

[7]) *E. Bredemann*, Apoth. Ztg. **21**, 41 (1906).

[8]) *W. Poethke*, Arch. Pharm. **275**, 357 (1937).

[9]) *L. C. Craig & W. A. Jacobs*, J. Biol. Chem. **143**, 427 (1942).

[10]) *W. L. Glen, G. S. Myers, R. Barber, P. Morozovitch & G. A. Grant*, Nature **170**, 932 (1952).

[11]) *M. W. Klohs, R. Arons, M. D. Draper, F. Keller, S. Koster, W. Malesh & F. J. Petracek*, Am. Soc. **74**, 5107 (1952).

255°, die spezifische Drehung in Chloroform $[\alpha]_D^{20} = -8{,}3°$ und die Bruttoformel $C_{39}H_{61}O_{13}N$ an. Für das Neoprotoveratrin bestimmte er den Smp. 255,4—255,8°, die spezifische Drehung in Pyridin $[\alpha]_D^{24} = -39°$, in Chloroform $[\alpha]_D^{24} = -3{,}8°$ und die Bruttoformel $C_{41}H_{63}O_{15}N$.

In eigenen Untersuchungen über die Veratrum-Alkaloide konnten wir das nach den Angaben von *Jacobs* aus Veratrum album isolierte und von ihm als ein einheitliches Alkaloid beschriebene[1]) Protoveratrin mit Hilfe der Gegenstromverteilung zwischen Benzol und Acetatpuffer pH 5,5 in zwei einheitliche Alkaloide zerlegen. Zur Unterscheidung vom Ausgangsmaterial schlagen wir dafür die Bezeichnungen Protoveratrin A und Protoveratrin B[2]) vor, während wir für das Gemisch der beiden den in der Literatur bisher gebräuchlichen Namen „Protoveratrin" beibehalten möchten.

Reines Protoveratrin A kristallisiert aus Alkohol in quadratischen Blättchen, die im Kupferblock zwischen 259° und 262°, auf dem *Kofler*-Block indessen zwischen 302° und 304° unter Zersetzung und Aufschäumen schmelzen. Protoveratrin A besitzt in Pyridin eine spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = -44{,}1° \pm 2°$, in Chloroform $[\alpha]_D^{20} = -12{,}1° \pm 2°$. Reines Protoveratrin B kristallisiert aus Alkohol ebenfalls in quadratischen Blättchen, die im Kupferblock zwischen 254° und 255°, auf dem *Kofler*-Block zwischen 285° und 290° unter Zersetzung und Aufschäumen schmelzen. Protoveratrin B hat in Pyridin eine spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = -39{,}8° \pm 2°$, in Chloroform $[\alpha]_D^{20} = -3{,}5° \pm 2°$. Auf Grund des Smp. und der spezifischen Drehungen in Pyridin und Chloroform könnte unser Protoveratrin B aus Veratrum album mit dem von *Klohs* beschriebenen Neoprotoveratrin aus Veratrum viride identisch sein.

Protoveratrin A und Protoveratrin B lösen sich in 84-proz. Schwefelsäure farblos auf; im Verlaufe von einer bis zwei Std. färbt sich die Lösung von Protoveratrin A kornblumenblau, von Protoveratrin B grün.

Für Protoveratrin schlug *Salzberger* die Bruttoformel $C_{32}H_{51}O_{11}N$ vor, die von *Poethke*[3]) auf $C_{40}H_{63}O_{14}N$ abgeändert wurde. Da *Poethke* nach der alkalischen Hydrolyse des Protoveratrins ausser dem amorphen Protoverin, dem er die Bruttoformel $C_{28}H_{45}O_{10}N$ zuschrieb, zwei mit Wasserdampf flüchtige Säuren (Essigsäure und (−)-α-Methylbuttersäure) und eine nicht flüchtige Säure ((+)-α-Methyl-α-oxybuttersäure) fand, fasste er das Protoveratrin als einen Tri-ester des Protoverins auf. *Jacobs* bestätigte in seiner ersten Arbeit die von *Poethke* für das Protoveratrin vorgeschlagene Bruttoformel, änderte sie dann aber auf $C_{39}H_{61}O_{13}N$[4]) ab, als er für das kristallisierte Proto-

[1]) *L. C. Craig & W. A. Jacobs*, l. c.

[2]) Wir folgen damit zugleich einem privat übermittelten Vorschlag von Prof. Dr. *Otto Krayer*, Harvard Medical School in Boston (USA.).

[3]) *W. Poethke*, Arch. Pharm. **275**, 571 (1937).

[4]) *W. A. Jacobs & L. C. Craig*, J. Biol. Chem. **149**, 271 (1943).

verin die Bruttoformel $C_{27}H_{43}O_9N$ fand. Die von ihm für das Protoveratrin angegebene Bruttoformel wurde auch von *Glen* und von *Klohs* übernommen, obgleich letzterer bei der Bestimmung der mit Wasserdampf flüchtigen Säuren 2,59 anstatt 2,0 Mol fand.

Bei Überprüfung dieser noch etwas unklaren Verhältnisse unter Verwendung einheitlicher Präparate fanden wir, dass das Protoveratrin A bei der alkalischen Hydrolyse in ein Mol Protoverin, zwei Mol Essigsäure, ein Mol (−)-α-Methyl-buttersäure und ein Mol (+)-α-Methyl-α-oxy-buttersäure gespalten wird. Demnach ist das Protoveratrin A ein Tetra-ester, für den sich aus den Spaltprodukten die Bruttoformel $C_{41}H_{63}O_{14}N$, entsprechend einem Molekulargewicht von 793,91, ergibt. Diese Bruttoformel steht in guter Übereinstimmung mit unseren Elementaranalysen und Molekulargewichtsbestimmungen.

Was das Alkamin anbetrifft, so erhielten sowohl *Jacobs* wie *Klohs* bei der alkalischen Hydrolyse des Protoveratrins mit methanolischer Natronlauge als basisches Spaltprodukt das Protoverin. Diesen Befunden stehen die von *Glen*[1]) in einer vorläufigen Mitteilung gemachten Angaben gegenüber, der nach der alkalischen Hydrolyse des Protoveratrins als Alkamin das Iso-protoverin isolierte. Da aber aus den Arbeiten von *Jacobs* bekannt ist, dass sich das Protoverin beim Erwärmen mit methanolischer Natronlauge in Iso-protoverin umlagert, so ist es naheliegend, dass eine solche Umlagerung auch bei der alkalischen Hydrolyse des Protoveratrins eintreten kann. Um die Frage nach dem genuinen Alkamin endgültig abzuklären, verseiften wir das Protoveratrin A möglichst schonend mit der berechneten Menge Pottasche in wässeriger-methanolischer Lösung bei Zimmertemperatur und erhielten schliesslich das kristallisierte Protoverin. Damit dürfte bewiesen sein, dass das genuine Alkamin von Protoveratrin A das Protoverin ist.

Das Protoveratrin B haben wir nach den von *Klohs* für das Neoprotoveratrin gemachten Angaben verseift und die von ihm beschriebenen Spaltprodukte aufgefunden. Sie ergeben für das Protoveratrin B die gleiche Bruttoformel $C_{41}H_{63}O_{15}N$, welche auch für das Neoprotoveratrin bestimmt wurde. Während *Klohs* von der aus dem Neoprotoveratrin erhaltenen α-Methyl-buttersäure nicht angibt, ob es sich dabei um die racemische oder die optisch aktive Form der Säure handelt, fanden wir, dass bei der Hydrolyse von Protoveratrin B die optisch aktive (−)-α-Methyl-buttersäure freigesetzt wird.

Nachfolgend sind die Hydrolysenprodukte von Protoveratrin A und Protoveratrin B, sowie die wichtigsten Daten der beiden Esteralkaloide zusammengestellt.

Protoveratrin A → Protoverin + { 2 Mol Essigsäure; 1 Mol (−)-α-Methyl-buttersäure; 1 Mol (+)-α-Methyl-α-oxy-buttersäure }

[1]) *W. L. Glen*, l. c.

$$\text{Protoveratrin B} \longrightarrow \text{Protoverin} + \begin{cases} 2 \text{ Mol Essigsäure} \\ 1 \text{ Mol } (-)\text{-}\alpha\text{-Methyl-buttersäure} \\ 1 \text{ Mol } (+)\text{-}\alpha\text{-Methyl-}\alpha,\beta\text{-dioxy-buttersäure} \end{cases}$$

Demnach unterscheidet sich das Protoveratrin B vom Protoveratrin A nur durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe an Stelle eines Wasserstoffatoms im (+)-α-Methyl-α-oxy-buttersäurerest.

Tabelle 1.

Eigenschaften von Protoveratrin A und Protoveratrin B.

	Protoveratrin A	Protoveratrin B
Bruttoformel	$C_{41}H_{63}O_{14}N$	$C_{41}H_{63}O_{15}N$
Smp. Cu-Block	259—262° (Zers.)	254—255° (Zers.)
Smp. *Kofler*-Block	302—304° (Zers.)	285—290° (Zers.)
$[\alpha]_D^{20}$ in Pyridin	$-44{,}1° \pm 2°$	$-39{,}8° \pm 2°$
$[\alpha]_D^{20}$ in Chloroform	$-12{,}1° \pm 2°$	$-3{,}5° \pm 2°$
Kristallisation aus Alkohol	quadratische Blättchen	quadratische Blättchen
Farbreaktion mit 84-proz. Schwefelsäure nach 2 Min.	farblos	farblos
nach 90 Min.	blau	grün

Entsprechend der nahen chemischen Verwandtschaft zeigen Protoveratrin A und Protoveratrin B in ihrer pharmakodynamischen Wirkung (Blutdrucksenkung usw.) nur geringfügige Unterschiede[1]).

Experimenteller Teil.

1. Protoveratrin A und Protoveratrin B. 8,0 g mehrmals aus Alkohol umkristallisiertes Protoveratrin, das wir nach den Angaben von *Jacobs*[2]) aus den Rhizomen von Veratrum album isolierten, wurden der Vorschrift von *Klohs*[3]) folgend, der Gegenstromverteilung zwischen Benzol und 2-mol. Acetatpuffer pH 5,5 unterworfen. Die Fraktionen 1—16, die zusammen 4,8 g wogen, löste man in 24 cm³ Chloroform und 35 cm³ Alkohol und destillierte dann aus der auf 30—40° erwärmten Lösung das Chloroform unter vermindertem Druck soweit ab, bis das Protoveratrin A auszukristallisieren begann. Nach 24stündigem Stehen bei 3° wurden die Kristalle abfiltriert und unter denselben Bedingungen aus Alkohol-Chloroform nochmals umkristallisiert. Dabei erhielt man 2,9 g reines Protoveratrin A in quadratischen Blättchen, die im Kupferblock zwischen 259—262°, auf dem *Kofler*-Block indessen zwischen 302—304° unter Zersetzung und Aufschäumen schmolzen. Die Kristalle färbten sich etwa 30° unterhalb ihres Zersetzungspunktes allmählich dunkelbraun.

$C_{41}H_{63}O_{14}N$ (793,91) Ber. C 62,01 H 7,99% Gef. C 61,90 H 7,79%

$[\alpha]_D^{20} = -44{,}1° \pm 2°$ (in Pyridin; c = 1,12)

$[\alpha]_D^{20} = -12{,}1° \pm 2°$ (in Chloroform; c = 3,2)

10 mg Protoveratrin A lösen sich in 2 cm³ 84-proz. Schwefelsäure farblos auf. Im Verlaufe von 2 Std. färbt sich die Lösung kornblumenblau; nach 24 Std. ist sie dunkelviolett gefärbt.

[1]) Privatmitteilung von Prof. Dr. *E. Rothlin*, Basel.

[2]) *L. C. Craig & W. A. Jacobs*, J. Biol. Chem. **143**, 427 (1942).

[3]) *M. W. Klohs* und Mitarbeiter, l. c.

Die Fraktionen 16—24 der Gegenstromverteilung lieferten 3,2 g rohes Protoveratrin B; daraus aus Chloroform-Alkohol 2,1 g quadratische Blättchen, Smp. im Kupferblock zwischen 254—255° und auf dem *Kofler*-Block zwischen 285—290°, unter Zers. und Aufschäumen; die Kristalle färbten sich etwa 30° unterhalb des Zersetzungspunktes allmählich braun.

$C_{41}H_{63}O_{15}N$ (809,91) Ber. C 60,80 H 7,84% Gef. C 60,70 H 8,05%

$[\alpha]_D^{20} = -39{,}8^0 \pm 2^0$ (in Pyridin; c = 1,24)

$[\alpha]_D^{20} = -3{,}5^0 \pm 2^0$ (in Chloroform; c = 3,1)

10 mg Protoveratrin B lösen sich in 2 cm³ 84-proz. Schwefelsäure farblos auf; im Verlaufe von einer Std. färbt sich die Lösung grün; nach 24 Std. ist sie dunkelviolett gefärbt.

2. Bestimmung des Molekulargewichtes von Protoveratrin A. 317 mg; 286 mg Protoveratrin A wurden in 10,00 cm³ 0,1-n. Schwefelsäure gelöst und nach Zugabe von 3 Tropfen Methylrot mit 0,1-n. Natronlauge zurücktitriert: verbraucht 5,97 cm³; 6,42 cm³ 0,1-n. NaOH.

$C_{41}H_{63}O_{14}N$ Mol.-Gew. Ber. 793,91 Gef. 786,6; 798,8

3. Alkalische Hydrolyse von Protoveratrin A. In einem mit Rückflusskühler versehenen Kolben wurden 3,0 g Protoveratrin A mit 15 cm³ 2-n. alkoholischer Kalilauge und 15 cm³ Wasser 1 Std. zum lebhaften Sieden erhitzt. Nach dem Abdestillieren des Alkohols im Vakuum wurde die dunkelgefärbte wässerige Lösung mit 30 cm³ 30-proz. Phosphorsäure versetzt und mit Wasserdampf destilliert. In Fraktionen von je 25 cm³ bestimmte man zuerst die optische Drehung und titrierte dann die Säuren mit 0,1-n. Natronlauge in Gegenwart von Phenolphtalein.

1. Fraktion	$\alpha_D^{20} = -0{,}75^0$	60,0 cm³	0,1-n. NaOH
2. Fraktion	$\alpha_D^{20} = 0^0$	21,1 cm³	„ „
3. Fraktion		9,9 cm³	„ „
4. Fraktion		6,7 cm³	„ „
5. Fraktion		4,7 cm³	„ „
6. Fraktion		3,5 cm³	„ „
7. Fraktion		2,1 cm³	„ „
8. Fraktion		1,6 cm³	„ „
9. Fraktion		0,9 cm³	„ „
Gefunden total		110,5 cm³	0,1-n. NaOH

Berechnet für 3 Säureäquivalente 113,3 cm³ 0,1-n. NaOH.

(−)-α-*Methyl-buttersäure:* Ber. 385,7 mg; Gef. gemäss opt. Drehung[1]) 375,0 mg.

Identifizierung der Essigsäure und der (−)-α-*Methyl-buttersäure:* Nach dem Abdestillieren des Wassers aus 160 cm³ des neutralisierten Destillates wurden die Salze der Essigsäure und der (−)-α-Methyl-buttersäure in üblicher Weise mit p-Phenylphenacylbromid in die entsprechenden Ester übergeführt. 700 mg der rohen Ester wurden auf eine aus 60 g Aluminiumoxyd bereitete Säule gebracht und mit Petroläther-Benzol 3:1 eluiert, wobei Fraktionen von je 25 cm³ aufgefangen wurden. Von der 12. Fraktion an bis zur 22. Fraktion wurde die Säule mit Petroläther-Benzol 3:2 eluiert.

Aus den ersten fünf Fraktionen (90 mg) erhielt man nach dem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther unverändertes p-Phenylphenacylbromid zurück, Smp. 123—125°. Aus den Fraktionen 6—11 (270 mg) kristallisierte aus Äther-Petroläther der p-Phenylphenacylester der (−)-α-Methyl-buttersäure aus, Smp. 70—72°, Misch-Smp. mit einem authentischen Präparat ebenso. Aus den Fraktionen 14—22 (395 mg) erhielt man nach dem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther grosse Blättchen vom Smp. 109—111°, die sich als p-Phenylphenacylester der Essigsäure erwiesen.

[1]) Die reine (−)-α-Methyl-buttersäure besitzt nach *J. Fried, H. L. White & O. Wintersteiner* (Am. Soc. **72**, 4621 (1950)) in Wasser eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{24} = -25^0$.

(+)-α-*Methyl-α-oxy-buttersäure:* Nach der Wasserdampfdestillation der flüchtigen Säuren wurde der Destillationsrückstand 4 Std. in einem Extraktor mit Äther extrahiert. Aus der dunkelgefärbten Ätherlösung führte man die Säure in 20 cm³ n. Natronlauge über, säuerte mit 50-proz. Schwefelsäure an und extrahierte erneut mit Äther. Nach dem Trocknen der Ätherlösung über Natriumsulfat und Abdestillieren des Lösungsmittels blieben 386 mg kristallisierte (+)-α-Methyl-α-oxy-buttersäure zurück; aus wenig Äther und viel Petroläther lange Nadeln vom Smp. 72—73°.

$[\alpha]_D^{20} = +8{,}5^0 \pm 2^0$ (in 0,2-n. Natronlauge; c = 0,88)[1])

Zur weiteren Identifizierung wurde die Säure in üblicher Weise in den p-Phenylphenacylester übergeführt: aus Äther grosse Prismen vom Smp. 118—119°.

$C_{19}H_{20}O_4$ (312,35) Ber. C 73,06 H 6,45% Gef. C 72,98 H 6,54%

4. Die Gewinnung von Protoverin aus Protoveratrin A. Zu einer Lösung von 174 mg Pottasche in 1,75 cm³ Wasser fügte man 10 cm³ Methanol und 500 mg Protoveratrin A hinzu. Bei öfterem Umschwenken ging das Protoveratrin A im Verlaufe von 2 Std. in Lösung. Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Methanol, das angenehm esterartig roch, im Vakuum abdestilliert und die klare wässerige Lösung nach Zugabe von 20 cm³ Wasser mit Chloroform im Extraktor erschöpfend digeriert. Schon nach zweistündiger Extraktion fielen aus der Chloroformlösung feine Nadeln aus, die nach dem Abfiltrieren und Trocknen 163 mg wogen. Einmaliges Umkristallisieren aus wenig Methanol lieferte 133 mg reines Protoverin in feinen Nadeln vom Smp. 220—222° (Zers.); Misch-Smp. mit authentischem Protoverin ohne Depression.

$[\alpha]_D^{20} = -15{,}7^0 \pm 2^0$ (in Pyridin; c = 1,1)

Zusammenfassung.

Protoveratrin aus den Rhizomen von Veratrum album wurde mittels Gegenstromverteilung zwischen Benzol und Acetatpuffer pH 5,5 in zwei einheitliche Alkaloide, Protoveratrin A und Protoveratrin B, zerlegt. Protoveratrin B dürfte mit dem aus Veratrum viride isolierten Neoprotoveratrin identisch sein.

Protoveratrin A, dem die Bruttoformel $C_{41}H_{63}O_{14}N$ zukommt, ist wie die Komponente B ein Tetra-ester. Alkalische Hydrolyse spaltet Protoveratrin A in ein Mol Protoverin, zwei Mol Essigsäure, ein Mol (−)-α-Methyl-buttersäure und ein Mol (+)-α-Methyl-α-oxy-buttersäure.

Protoveratrin A und Protoveratrin B unterscheiden sich nur dadurch, dass die B-Komponente an Stelle der (+)-α-Methyl-α-oxy-buttersäure des Protoveratrin A die (+)-α-Methyl-α,β-dioxy-buttersäure trägt. Die geringen Unterschiede in der pharmakodynamischen Wirkung der beiden Alkaloide finden damit ihre Erklärung.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium
„*Sandoz*", Basel.

[1]) Für die (+)-α-Methyl-α-oxy-buttersäure, die als Spaltprodukt des Germitrins und des Germerins vorkommt, geben *J. Fried, H. L. White & O. Wintersteiner* (l. c.) den Smp. 72,5—73,5° und eine spez. Drehung in 0,2-n. Natronlauge von $[\alpha]_D^{24} = +12^0$ an.