

178. Rudolf Tschesche und Friedlieb Seehofer: Über pflanzliche Herzgifte, XXVI. Mitteil.*): Die Cardenolid-Glykoside der Blätter von *Convallaria majalis*

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstitutes der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 2. Juni 1954)

Herrn Prof. Dr. H. H. Schlubach zum 65. Geburtstag gewidmet

Aus den Blättern des Maiglöckchens, *Convallaria majalis* L., wurden in kristallisierter Form, neben dem schon bekannten Convallatoxin, auch Convallatoxol und Convallosid isoliert. Ferner wurden zwei kristallisierte Glykoside gewonnen, deren Aglykon auf Grund des UV-Spektrums keine Aldehydgruppe, sondern vermutlich eine Ketogruppe enthält; sie erhielten die Bezeichnung Vallarotoxin und Majalosid. Ihre Zucker sind Rhamnose bzw. Rhamnose und Glucose. Es wurde weiter das Vorkommen von Convallatoxolosid und Gluco-convallosid wahrscheinlich gemacht. Daneben finden sich noch zwei Glykoside vor, in deren Aglykonen keine Oxogruppe vorkommt; sie konnten aber noch nicht kristallisiert erhalten werden.

Die bisherigen Versuche, die herzwirksamen Inhaltsstoffe der Blätter des Maiglöckchens, *Convallaria majalis* L., in kristallisierter Form zu gewinnen, haben nur zur Isolierung des Convallatoxins durch K. Mohr und T. Reichstein¹⁾ geführt. Dieses Glykosid hatte schon vorher W. Karrer²⁾ aus den Blüten gewonnen. Es handelt sich dabei um das *l*-Rhamnose-Derivat des Strophanthidins³⁾. Aus den Samen der gleichen Pflanze haben J. Schmutz und T. Reichstein⁴⁾ das um 1 Mol. Glucose reichere Convallosid gewonnen, welches aber in den Blättern nicht nachgewiesen werden konnte¹⁾.

Eine Neuuntersuchung der Blätter erschien deswegen wünschenswert, weil Blattextrakte aus *Convallaria majalis* auch heute vielfach medizinische Verwendung finden, ohne daß die chemische Natur der Wirkstoffe genügend bekannt ist. Weiter aber war es aus biogenetischen Gründen interessant, festzustellen, ob das in vielen Strophanthus-Arten⁵⁾ beobachtete Nebeneinander

*) XXV. Mitteil.: R. Tschesche u. G. Grimmer, Chem. Ber. 87, 418 [1954].

¹⁾ Pharmac. Acta Helvetiae 23, 369 [1948]. ²⁾ Helv. chim. Acta 12, 506 [1929].

³⁾ R. Tschesche u. W. Haupt, Ber. dtsch. chem. Ges. 69, 459 [1936]; L. F. Fieser u. R. P. Jacobsen, J. Amer. chem. Soc. 59, 2335 [1937]; T. Reichstein u. A. Katz, Pharmac. Acta Helvetiae 18, 527 [1943]; A. Katz, ebenda 22, 244 [1947]; K. Reyle, K. Meyer u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 33, 1541 [1950].

⁴⁾ Pharmac. Acta Helvetiae 22, 359 [1947].

⁵⁾ Aus *Stroph. kombé* A. Katz u. T. Reichstein, Pharmac. Acta Helvetiae 19, 231 [1944]; W. Blome, A. Katz u. T. Reichstein, ebenda 21, 325 [1946].

Aus *Stroph. Eminii* Aschet Pax: J. D. Lamb u. S. Smith, J. chem. Soc. [London] 1936, 442; A. Lardon, Helv. chim. Acta 33, 639 [1950].

Aus *Stroph. hypoleucus* Stapf: J. v. Euw u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 33, 544 [1950].

Aus *Stroph. Nicholsonii* Holm: J. v. Euw u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 31, 883 [1948].

Aus *Stroph. mirabilis* Gilg: P. R. O. Bally, O. Schindler u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 35, 138 [1952]; E. Primo u. Ch. Tamm, Helv. chim. Acta 37, 14 [1954].

Aus *Stroph. Ledienii* Stein: H. Hess, P. Speiser, O. Schindler u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 34, 1854 [1951].

von Strophanthidin-, Strophanthidol- und Periplogeninglykosiden sich auch hier wiederfindet. Die Genine der genannten Glykoside unterscheiden sich an C¹⁰ dadurch, daß die Aldehydgruppe des Strophanthidins in den beiden anderen Verbindungen durch CH₂OH bzw. CH₃ ersetzt ist.

Es schien von vornherein wenig aussichtsreich, durch Anwendung der bisher in der Chemie der Herzgiftglykoside benutzten Methoden zu einer Auftrennung des komplizierten Gemisches des Blattextraktes zu kommen. Die Anwendung der Chromatographie der Glykosid-acetate an Aluminiumoxyd, wie sie auch schon Mohr und Reichstein¹⁾ versucht haben, sowie der Gegenstromverteilung (in unserem Institut von H. B. König durchgeführt⁶⁾), führten nur zur Isolierung des Hauptglykosides Convallatoxin. Eine Lösung des Problems wurde schließlich dadurch erzielt, daß die von uns kürzlich beschriebene Methode der „echten Verteilungschromatographie an Papier“⁷⁾ im präparativen Maßstab durchgeführt und der Trenneffekt bei der Chromatographie an Aluminiumoxyd für die freien, weniger wasserlöslichen Glykoside nach einem Vorschlag von G. Grimmer in unserem Institut dadurch verbessert wurde, daß das Adsorptionsmittel vor der Anwendung durch Sieben auf einheitliche Korngröße gebracht wurde. Die Kombination beider Verfahren erbrachte schließlich einen Teilerfolg.

Die Bedeutung der Teilchengröße für den Adsorptionseffekt ist eigentlich selbstverständlich, wird aber bei der Trennung von Gemischen durch Adsorption nicht immer genügend berücksichtigt. Als wir die im Handel befindlichen Präparate von Aluminiumoxyd (standardisiert zur Adsorption nach Brockmann) auf ihre Teilchengröße untersuchten, ergab sich folgendes Bild:

Kennzahl Maschen/cm ²	∅ mm	Präparat der Firma M. Woelm (Eschwege)	Präparat der Firma E. Merck (Darmstadt)
3600	> 0.12	17%	19%
4900	0.10	6%	5%
6400	0.085	29%	20%
10000	0.068	25%	21%
16900	0.055	9%	13%
Durchlauf	< 0.050	14%	22%

Die Kennzahl gibt die Zahl der Maschen des Siebes/cm² an, auf dem die entsprechende Fraktion des Aluminiumoxyds nach 45 Min. Schütteln noch liegen bleibt⁸⁾. Zur Anwendung kam der Apparat „Schallfix“ der Firma Rhewum, Remscheid-Lüttringhausen. Für die Adsorption wurden Fraktionen der Kennzahlen 4900, 6400, 10000 und 16900, je nach der gewünschten Stärke der Oberflächenenergie, verwendet; die Adsorption nimmt mit abnehmender Teilchengröße zu.

⁶⁾ Dissertat. Hamburg, 1950.

⁷⁾ R. Tschesche, G. Grimmer u. F. Seehofer, Chem. Ber. **86**, 1235 [1953].

⁸⁾ Wir danken Herrn Dr. G. Grimmer in unserem Institut sehr für die vorgenommene Teilchenanalyse. — Auf die Bedeutung der Teilchengröße für die Stärke des Adsorptionseffektes ist stets hingewiesen worden (vergl. L. Zechmeister u. L. v. Cholnoký, „Die chromatographische Adsorptionsmethode“, S. 44, J. Springer 1938). Um so erstaunlicher ist es, daß die Aluminiumoxyde des Handels (standardisiert zur Chromatographie) in der Teilchengröße derartig weite Mischungen darstellen.

Folgende Glykoside wurden aus dem Blattextrakt entweder kristallisiert isoliert oder zum mindesten nachgewiesen:

Substanz	geschätzt. Gehalt mit der Reaktion nach Kedde ⁸⁾	R _F -Wert in Wasser/Pentanol
1. A (Vallarotoxin)*)	0.012	0.30
2. B (nicht kristall.)	0.007	0.51
3. C ₁ (nicht kristall.)	0.005	0.65
4. C ₂ (Majalosid)*)	0.006	0.71
5. C ₃ (Convallatoxin)*)	0.050	0.73
6. C ₄ (Convallatoxol)*)	} 0.010	0.75
7. D ₁ (Convallolid)*)		0.85
8. D ₂ (Convallatoxolid?)	0.015	0.87
9. E (Gluco-convallolid?)	0.005	0.93

Die mit einem Sternchen versehenen Glykoside wurden kristallisiert erhalten.

Substanz	Färbungen mit konz. Schwefelsäure					Färbungen mit Antimontrichlorid			
	0 Min.	1 Min.	5 Min.	20 Min.	1 Stde.	bei Tageslicht nach 30 Sek.	5 Min.	im UV-Licht nach 30 Sek.	5 Min.
A	hellbraun	hellbraun	grünlichbraun	olivblau	grünlichblau	kakaobraun	violettgrau	kupferfarben	rotbraun
B	hellbraun	rotbraun	grünlichbraun	olivbraun	oliv	rehbraun	grauoliv	goldfarben	rotbraun
C ₁	rötlich	rotbraun	dunkelbraun	blaugrau	blaugrau	graubraun	olivgrau	rotbraun	hellbraun
C ₂	rötlich	braun	grünlichbraun	olivgrau	blaugrau	graubraun	bläulichgrau	rotbraun	hellbraun
C ₃	rot	sattgelb	olivgelb	grünlichbraun	sattgrün	sattgelb	pastellgrün	orange-rot	blaugrün
C ₄	gelblich	braun	rehbraun	violettstichig braun	braunoliv	orange	blaugrün	braunrot	schmutzigbraun
D ₁	grünlich	gelbrot	zitronengelb	gelbgrün	grüngrün	hellgelb	olivgrau	zitronengelb	tiefblau
E	rötlich	braun	rotbraun	braunviolett	bläulichgrün	graubraun	grau	zitronengelb	schmutzigbraun

Der R_F-Wert bei der Verteilungschromatographie an Papier und die erhaltenen Färbtönungen mit Antimontrichlorid und konz. Schwefelsäure gestatteten eine gute Zuordnung der einzelnen Glykoside in verschiedenen Fraktionen. Sie erlaubten auf Grund der Farbreaktionen nach D. L. Kedde⁸⁾ auch eine größenordnungsmäßige Bestimmung der einzelnen Glykoside. Die Gesamtmenge der Cardenolidglykoside in getrockneten Blättern beträgt etwa 0.1%. In einer Probe frischer Blätter wurden die gleichen Glykoside papierchromatographisch gefunden. Die Glykoside A,B und 2/3 der C-Verbindungen fanden sich in der Chloroform/Äthanol-Ausschüttelung (9:1), während der Rest der Glykoside erst mit Chloroform/Äthanol (1:1) der wäbr. Phase entzogen werden konnte. Die Verbindung E wurde auch so noch nicht restlos entfernt, so daß die Gehaltsangabe bei diesem Glykosid zu niedrig sein kann.

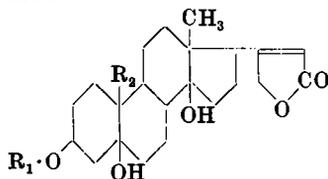
Glykosid C₃ wurde nach Chromatographie des Chloroform/Äthanol-Extraktes (9:1) an Aluminiumoxyd der Kennzahl 10000 kristallisiert erhalten (Frakt. 15-17) und erwies sich durch Schmp. (236-242⁰, [α]_D²⁰: -0.8⁰) und Mischschmelzpunkt mit authentischem Convallatoxin^{xx)} identisch. Bei der Säurespaltung entstand Rhamnose, die papierchromatographisch identifiziert wurde,

⁸⁾ Dissertat. Leyden, 1946; Ausführung nach J. E. Bush u. D. A. H. Taylor, Biochem. J. 52, 643 [1952].

^{xx)} Das verwendete Convallatoxin wurde uns freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche A.G. (Basel) überlassen; ihr sei hierfür vielmals gedankt.

und Anhydro-strophanthidin. Letzteres wurde ebenfalls mit einem aus Strophanthidin in gleicher Weise hergestellten Anhydro-Derivat papierchromatographisch verglichen und der gleiche R_F -Wert erhalten. Auch die Färbungen mit konz. Schwefelsäure waren gleich.

Glykosid C_4 , in gleicher Weise wie C_3 , nur aus den Fraktionen 23 und 24 der Aluminiumoxyd-Chromatographie gewonnen, kristallisierte aus Methanol-Aceton-Äther in Prismen und erwies sich als Convallatoxol (Schmp. 170 bis 172°, $[\alpha]_D^{18}$: -10.4^0). Die gleichen Eigenschaften geben auch A. Hunger und T. Reichstein⁹⁾ für ihr durch Reduktion mit Natriumborhydrid aus Convallatoxin erhaltenes Convallatoxol an, in dem die $-HCO$ -Gruppe an C^{16} durch $-CH_2OH$ im Strophanthidin-Teil der Molekel ersetzt ist. Wir haben diese Reduktion wiederholt und die beiden Verbindungen im Misch-Schmelzpunkt verglichen, wobei keine Erniedrigung eintrat. Weiter wurde eine Probe unseres aus den Blättern gewonnenen Convallatoxols mit Säure gespalten und die gebildete Rhamnose papierchromatographisch nachgewiesen. Entsprechend wurde das auch dabei erhaltene Anhydro-strophanthidol (ohne Isolierung) mit einem aus Strophanthidol erhaltenen Anhydroderivat im Papierchromatogramm als identisch befunden; das gleiche gilt für die Schwefelsäurefärbung. Damit ist das bisher nur künstlich bereitete Convallatoxol in der Natur aufgefunden worden.



- Convallatoxin: $R_1 = l$ -Rhamnose, $R_2 = -HCO$,
 Convallatoxol: $R_1 = l$ -Rhamnose, $R_2 = -CH_2OH$,
 Convallolid: $R_1 = l$ -Rhamnose und d -Glucose, $R_2 = -HCO$,
 Convallatoxolid: $R_1 = l$ -Rhamnose und d -Glucose, $R_2 = -CH_2OH$,
 Gluco-convallolid: $R_1 = l$ -Rhamnose und 2 d -Glucose, $R_2 = -HCO$.

Das Glykosid D_1 wurde durch Chromatographie des Chloroform/Äthanol-Extraktes (1:1) an Amberlit I R-4-B in wäbr. Lösung erhalten. Die zweite Kedde-positive Fraktion aus der Säule kristallisierte. Auch durch präparative Papierchromatographie nach dem Verfahren der Verteilungschromatographie⁷⁾ konnte dieses Glykosid gewonnen werden. Es erwies sich als identisch mit dem von J. Schmutz und T. Reichstein⁴⁾ aus den Samen gewonnenen Convallolid (Schmp. 201–205°; $[\alpha]_D^{18}$: $-9.4^0 \pm 5^0$; Lit.⁴⁾: Schmp. 201–204°, $[\alpha]_D^{15}$: $-10.4^0 \pm 3^0$). Auch hier wurden weiter die Zucker papierchromatographisch als Glucose und Rhamnose identifiziert, sowie in gleicher Weise das gebildete Anhydro-strophanthidin durch den R_F -Wert und die Schwefelsäurefärbung charakterisiert. Auch das Convallolid-acetat erwies sich mit einem authentischen Präparat von Reichstein^{+,4)} in bezug auf den R_F -Wert im Papierchromatogramm als identisch.

⁹⁾ Chem. Ber. 85, 635 [1952].

^{+) Convallolid-acetat wurde uns von Prof. Dr. T. Reichstein (Basel), dem wir hiermit unseren besonderen Dank ausdrücken möchten, zum Vergleich zugesandt.}

Die Glykoside D₂ und E konnten bisher nicht kristallisiert werden. Das Nebeneinander von Convallatoxin und Convallatoxol in den Blättern ließ die Vermutung aufkommen, es könnte auch das dem Convallosid entsprechende Convallatoxolosid vorhanden sein. In ihm ist das Aglykon Strophanthidin durch Strophanthidol ersetzt, die Zucker sind Rhamnose und Glucose. Zur Prüfung dieser Vermutung wurde Convallosid mit Natriumborhydrid reduziert und im Papierchromatogramm ein R_F -Wert erzielt, der genau dem des Glykosids D₂ entsprach. Es scheint also nicht unmöglich, daß auch Convallatoxolosid in den Blättern vorkommt. Eine Reindarstellung war deswegen unmöglich, weil es papierchromatographisch von Convallosid präparativ nicht zu trennen war.

Glykosid E dürfte vermutlich ein Gluco-convallosid sein. In diesem Falle konnte das Glykosid mittels Papierchromatographie als einheitlich laufendes Material isoliert werden. Bei der Mikrosplaltung mit Säure ließen sich in vorstehend beschriebener Weise Anhydro-strophanthidin sowie Rhamnose und Glucose im Verhältnis 1:2 nachweisen. Eine Unterstützung dieser Auffassung des Glykosids E als Gluco-convallosid ergab die fermentative Spaltung durch ein Fermentpräparat aus *Aspergillus oryzae* (Luizym). Danach konnten im Papierchromatogramm durch den R_F -Wert und die Färbung Convallatoxin und Convallosid im Verhältnis 1:4 sowie die abgetrennte Glucose nachgewiesen werden.

Als weitere kristallisierte Glykoside konnten mittels präparativer Papierchromatographie A und aus Frakt. 13 der Aluminiumoxyd-Chromatographie (Kennzahl 10000) C₂ isoliert werden. Die Mikro-Säuresplaltung lieferte aus A Rhamnose und aus C₂ Rhamnose und Glucose. Da das UV-Spektrum der Glykoside A und C₂ das Vorliegen einer Ketogruppe im Aglykon (λ_{\max} 285 m μ , $\log \epsilon$ 1.53 und 1.41) (siehe Abbild.) wahrscheinlich macht, bestand die Möglichkeit, daß das Aglykon in beiden Fällen das gleiche ist. Die beiden Glykoside würden dann im gleichen Verhältnis wie Convallatoxin und Convallosid zueinander stehen. Mit dieser Auffassung stimmen aber einerseits die erhaltenen Färbungen mit konz. Schwefelsäure nicht gut überein, ebenso die Feststellung, daß die Werte für die optische Drehung sich beim Vergleich zwischen Convallatoxin und Convallosid nach negativeren Werten (-0.8° und -10.4°), bei A und C₂ aber in umgekehrter Richtung (-17.7° und -10.1°) ändern. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß das Aglykon in A und C₂ nicht das gleiche ist. Wir haben das Glykosid A mit dem Namen Vallarotoxin und das Glykosid C₂ mit der Bezeichnung Majalosid belegt.

Die Summenformel beider Verbindungen muß zur Zeit noch unbestimmt bleiben, da ein Kristallwassergehalt in den Glykosiden nicht ausgeschlossen werden kann. Für das Aglykon des Vallarotoxins bleibt die Möglichkeit C₂₃H₃₂O₈ gegeben, während das Genin des Majalosids die Formel C₂₃H₃₂O₅ haben kann. Zur Klärung dieser Fragen muß zunächst einmal weiteres Ausgangsmaterial beschafft werden. Mit dem Vorliegen einer Ketogruppe im Aglykon des Majalosids stimmt die Feststellung überein, daß der ihm zukommende Fleck bei der Papierchromatographie nach Reduktion mit Natriumborhydrid zum Verschwinden kommt.

Die Glykoside B und C₁ konnten nicht kristallisiert werden, obwohl sie sich papierchromatographisch als einheitlich erwiesen. B gab bei der Säure-

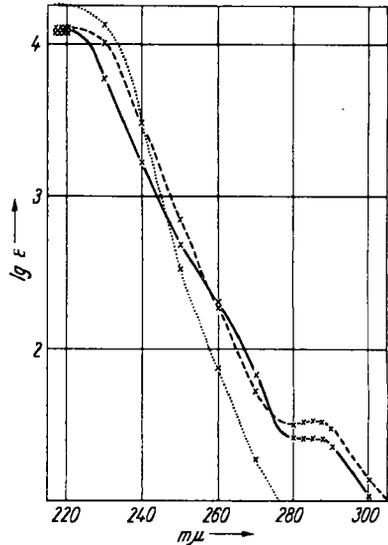
spaltung Rhamnose und Glucose, die papierchromatographisch ermittelt wurden. Das nicht kristallisiert isolierte Anhydro-genin von B zeigte bei der Behandlung mit konz. Schwefelsäure den gleichen Ablauf der Färbungen wie das von A, so daß zwischen beiden Glykosiden A und B eher eine Identität im Aglykon zu erwarten ist als zwischen A und C₂. Merkwürdigerweise fanden wir bei Glykosid C₁ obwohl es im Papierchromatogramm schneller lief als das Glykosid B als Zucker nur Rhamnose. Sein Anhydro-genin zeigte mit konz. Schwefelsäure die gleichen Farbwerte wie das Anhydro-genin von C₂. Es ließ sich aber mit Natriumborhydrid nicht reduzieren. Der R_F-Wert im Papierchromatogramm blieb bestehen. Damit übereinstimmend zeigte das Glykosid im UV weder eine Aldehydnach noch eine Ketogruppe an. Der gleiche Befund wurde auch bei B gemacht (siehe Abbild.).

Die Untersuchung der Blätter von *Conval-laria majalis* L. erlaubt damit die Feststellung, daß hier ebenso wie in einer Reihe von Strophanthus-Samen sich ein Gemisch von Glykosiden findet, die sich im Oxydationsgrad des C¹⁰-Atoms unterscheiden⁺⁺). Während eine -CH₂OH-Gruppe (Strophanthidol) und eine -HCO-Gruppe (Strophanthidin) in den Aglykonen mit Sicherheit nachgewiesen sind (Ringverknüpfung A/B *cis*), ist auch das Vorliegen der entsprechenden CH₃-Verbindungen an C¹⁰ sehr wahrscheinlich. Hier wie auch bei den am Anfang der Arbeit erwähnten Strophanthus-Arten ist niemals ein Aglykon mit Carboxyl an C¹⁰ aufgefunden worden. Auch aus anderen Pflanzen sind solche Verbindungen nicht bekannt, obwohl die Oxydation einer Aldehydgruppe an C¹⁰ bei Ringverknüpfung A/B *trans* besonders leicht erfolgt. Schon beim Stehenlassen in Lösung tritt schnelle Oxydation bei Derivaten des Corotoxigenins¹⁰) und Bovogenins A¹¹) an der Aldehydgruppe auf. Diese Beobachtungen machen es wenig wahrscheinlich, daß die sauerstoffärmeren Aglykone Vorstufen der sauerstoffreicheren sind, sondern eher umgekehrt. Vermutlich sind die Verbindungen mit Aldehydgruppe an C¹⁰ biogenetisch frühere Produkte, die in den Pflanzen und in Kröten in verschiedenem Ausmaß und an unterschiedlichen Stellen in der Molekel in sauerstoffärmere übergeführt werden. Das würde bedeuten, daß reduktive Prozesse in den Endstufen der Bildung dieser Stoffe im Vordergrund stehen.

⁺⁺) Auch in den Samen des Goldlacks (*Cheiranthus cheiri* L.) wurden Strophanthidin- und Uzarigenin-Glykoside nebeneinander vorgefunden (H. Schwarz, A. Katz u. T. Reichstein, *Pharmac. Acta Helveticae* **21**, 250 [1946]; N. M. Shah, K. Meyer u. T. Reichstein, ebenda **24**, 113 [1949]; J. A. Moore, Ch. Tamm u. T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **37**, 755 [1954].

¹⁰) A. Stoll, A. Pereira u. J. Kreis, *Helv. chim. Acta* **32**, 293 [1949]; O. Schindler u. T. Reichstein, ebenda **35**, 730 [1952]; A. Hunger u. T. Reichstein, ebenda **35**, 1073 [1952].

¹¹) A. Katz, *Helv. chim. Acta* **36**, 1417 [1953]; **37**, 451, 1420 [1954].



UV-Spektren in Methanol ($c = 0.02 \text{ g/l}$);
 x ——— x A (Vallarotoxin), x - - - - x C₂
 (Majalosid), x ····· x C₄ (Convallatoxin)

Diese Annahme läßt sich vielleicht auch noch anderweitig stützen. Von den Aglykonen mit OH-Gruppe an C⁵ sind bisher nur solche der *cis*-Reihe in bezug auf die Ringe A und B bekannt (Strophanthidin, Periplogenin, Telocinobufagin und Hellebrigenin). Die der *trans*-Reihe fehlen als Naturstoffe völlig, obwohl auf diesem Gebiet schon ein recht umfangreiches Tatsachenmaterial vorliegt. Auch sind Steroidderivate mit OH an C⁵ bei *trans*-Verknüpfung der Ringe A und B auf rein chemischem Wege hergestellt worden¹²⁾.

Ferner sind solche mit einer Doppelbindung Δ^4 bekannt (in der Cardenolid-Reihe das Aglykon des soeben aufgefundenen Acofriosids¹³⁾, in der Bufadienolid-Reihe Scillarenin und Scilliglaucoosidin¹⁴⁾). Es läßt sich daher vermuten, daß Verbindungen der *cis*-Reihe in bezug auf die Ringe A und B mit OH an C⁵ primär sind. Kommt es zur Wasserabspaltung, so kann die nachfolgende Wasserstoffanlagerung entweder in die *cis*-Reihe in bezug auf die Ringe A und B führen (Digitoxigenin, Digoxigenin, Sarmentogenin, Gitoxigenin u. a.) oder aber zur *trans*-Verknüpfung der Ringe A und B Anlaß geben, wie sie im Uzaringenin, Corotoxigenin, Bovogenin A u. a. vorliegt. Auch hier sprechen die Tatsachen in den Endphasen der Biogenese mehr für reduktive als für oxydative Prozesse⁺⁺⁺⁾. Es ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert, daß die biologische Oxydation von Steroidderivaten durch Mikroorganismen niemals zu einer Einführung von Sauerstoff an C⁵, C¹⁴ oder C¹⁹ geführt hat¹⁵⁾, eine Substitution, die für Cardenolide und Bufadienolide mehrfach gefunden wurde, an C¹⁴ aber die Regel ist¹⁵⁾.

Was das Vorkommen einer Ketogruppe in den Aglykonen von Vallarotoxin und Majalosid angeht, so ist eine solche neuerdings von R. Richter, O. Schindler und T. Reichstein¹⁷⁾ auch in den Glykosiden Sarmutosid und Musarosid aufgefunden worden, denen das gleiche Aglykon Sarmutogenin zukommt. Die genannten Glykoside stammen aus den Samen von *Strophantus sarmentosus* A.P.DC.¹⁸⁾. In den Blättern von *Convallaria majalis* L. finden sich diese unterschiedlich mit Sauerstoff substituierten Cardenolide alle nebeneinander vor, sie sind hier ihrem Entstehungsort näher als in den Samen, wo vermutlich nur noch bestimmte Glykoside zur Ablagerung gelangen. Die Verhältnisse entsprechen damit etwa denen in der weißen Meerzwiebel, *Urginea maritima* (Baker) L., in der ebenfalls an C¹⁰ Aldehyd- und Methylderivate nebeneinander vorkommen, während das 12-Ketoderivat Scillirosid bisher in größerer Menge nur in der sehr nahe verwandten Varietät der roten Meerzwiebel gefunden wurde.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft auch an dieser Stelle vielmals für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Ferner sei auch der Firma P. Beiersdorf & Co., Hamburg, für die Bereitstellung des Ausgangsmaterials für diese Untersuchungen gedankt.

¹²⁾ Pl. A. Plattner, H. Heusser u. A. B. Kulkarni, *Helv. chim. Acta* **32**, 1070 [1949]; H. McKennis jr. u. G. W. Gaffney, *J. biol. Chemistry* **175**, 217 [1948].

¹³⁾ H. Muhr, A. Hunger u. T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **37**, 401 [1954].

¹⁴⁾ A. Stoll, A. v. Wartburg u. J. Renz, *Helv. chim. Acta* **36**, 1531, 1557, 1565 [1953].

⁺⁺⁺⁾ Dies würde auch dann der Fall sein, wenn die Δ^4 - bzw. Δ^5 -ungesättigten Verbindungen primär wären und diejenigen mit OH an C⁵ durch anschließende Wasseranlagerung statt Wasserstoff entstanden sind. Das Fehlen der *trans*-Derivate in bezug auf die Ringe A und B müßte dann in der Spezifität des hierfür zuständigen Fermentes gesucht werden.

⁵⁾ R. Tschesche u. F. Korte, *Angew. Chem.* **64**, 635 [1952]; **65**, 81 [1953]; **66**, 32 [1954].

¹⁶⁾ D. Perlman, E. Titus u. J. Fried, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 2126 [1952]; J. Fried, R. W. Thoma, J. R. Gerke, J. E. Herz, M. N. Donin u. D. Perlman, ebenda **74**, 3962 [1952]; J. Fried, R. W. Thoma u. A. Klingsberg, ebenda **75**, 5764 [1953].

¹⁷⁾ *Helv. chim. Acta* **37**, 76 [1954].

¹⁸⁾ R. Richter, K. Mohr u. T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **36**, 1073 [1953].

Beschreibung der Versuche

Als Ausgangsmaterial dienten getrocknete und pulverisierte Maiglöckchenblätter, die 3mal mit Methanol bei Zimmertemperatur extrahiert wurden. Der Methanolextrakt wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Nach der üblichen Vorreinigung mit basischem Bleiacetat und Entfernung des überschüssigen Bleis wurde die wäbr. Lösung nacheinander mit Petroläther, Benzol, Äther, Chloroform (1mal) Chloroform/Äthanol (9:1) (6mal) und Chloroform/Äthanol (1:1) (8mal) ausgeschüttelt. Nur die Fraktionen mit Chloroform und Chloroform/Äthanol enthielten auf Grund der Reaktion nach Kedde⁸⁾ Cardenolid-Glykoside. In der wäbr. Restlösung sind solche ebenfalls noch in geringer Menge vorhanden, jedoch ist ihre Bestimmung auf Grund der starken Eigenfarbe des Extraktes nicht mit Sicherheit möglich.

Chromatographie des Chloroform- und des Chloroform/Äthanol-Extraktes (9:1)

5.985 g Trockensubstanz der vereinigten Extrakte (aus ca. 6 kg Blättern) wurden in 50 ccm Chloroform gelöst und an einer Säule mit Aluminiumoxyd (Korngröße Kennzahl 10000) in üblicher Weise nach dem Durchlaufverfahren chromatographiert. Es wurden folgende Fraktionen erhalten, wobei von den angewandten Lösungsmitteln je 250 ccm aufgefangen wurden:

Nr.	Lösungsmittel	Kedde	mg	Rückstand	A in %	B in %	C in %	D in %
1	Chloroform	m.	88	g.Öl				
2	„		46	g.S.				
3	„	s.	127	g.Sch.	10			
4	„	s.	74	g.S.	10	+		
5	„	m.	34	g.S.	30	+		
6	Chlf.+1% M	m.	129	h.br.S.	30	10	+	
7	„	st.	231	h.br.Sch.	50	30	+	
8	„	s.st.	191	h.br.S.	50	30	+	
9	„	st.	98	g.S.	30	30	+	
10	„	st.	21	g.S.	10	30		10
11	Chlf.+2% M	st.	376	h.br.Sch.	+	10		10
12	„	st.	229	g.Sch.		+		30
13	„	st.	195	f.Sch.				70
14	„	st.	107	g.Sch.				70
15	„	s.st.	18	g.Sch.				70
16	Chlf.+5% M	s.st.	170	h.g.Sch.				70
17	„	s.st.	104	f.Sch.				70
18	„	s.st.	85	g.Sch.				70
19	„	st.	37	f.Sch.				50
20	„	st.	9	g.S.				30
21	Chlf.+20% M	s.st.	418	g.Sch.				50
22	„	s.st.	375	g.S.				70
23	„	st.	212	g.S.				70
24	„	st.	115	f.Sch.				70
25	„	st.	163	f.Sch.				50
26	Methanol	st.	329	g.Sch.				30
27	„	m.	244	g.S.				10
28	„	st.	288	g.Sch.				10
29	„	m.	98	g.S.				+
30	„	—	77	br.S.				10
			4.688 g					

Abkürzungen: m. = mittel, s. = schwach, st. = stark, s.st. = sehr stark, f. = farblos, g. = gelb, br. = braun, h.g. = hellgelb, Sch. = Schaum, S. = Sirup.

Die Zusammensetzung der erhaltenen Fraktionen in bezug auf Cardenolid-Glykoside wurde mit Hilfe der Verteilungspapierchromatographie untersucht⁷⁾ und der Gehalt mit der Farbreaktion nach Kedde auch quantitativ annähernd bestimmt. Dazu wurden jedesmal 1 mg Substanz in 0.2 ccm Methanol gelöst und pro Fleck 0.03 ccm aufgetragen, bei einem schwach positiven Kedde-Test 0.06 ccm. Das Auftragen wurde auf trockenem Papier vorgenommen und solches der Firma Macherey & Nagel (Düren) Nr. 61 verwendet, wenn mit Lösungsmittelgemisch III und IV (s. unten) gearbeitet wurde. Für die Gemische I, II und V hat sich das Papier Schleicher & Schüll (Dassel) Nr. 2043a besser bewährt.

Folgende Lösungsmittelgemische wurden verwendet:

Gemisch I: Octanol/Pentanol/Wasser/Formamid 6:2:1:4

Gemisch II: Octanol/Pentanol/Wasser/Formamid 6:2:8:2

Gemisch III: Pentanol/Wasser

Gemisch IV: Isobutanol/Wasser

Gemisch V: Butanol/Pyridin/Wasser (leichte Phase) (bei trockenem Papier) 3:1:3

Die nachfolgende Tabelle gibt die verwendeten Lösungsmittel bei der Papierchromatographie in Abhängigkeit von der Natur der vorliegenden Glykoside bzw. Aglykone wieder.

Substanz	Gemisch				
	I	II	III	IV	V
Genine und Anhydrogenine	+	+			
Acetate		+			
A und B		+			
C-Komplex			+	+	
D-Komplex und E			+	+	+

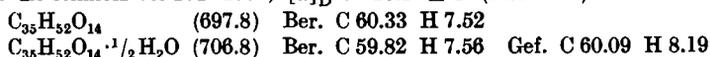
Eingesprüht wurde das Papier stets mit der alkoholischen Phase, während die mehr wäßrige zum Entwickeln des Chromatogramms verwendet wurde. Gearbeitet wurde absteigend in Standzylindern, und der Ort auf dem Papier nach vorherigem Trocknen bei 100° durch Besprühen mit dem Reagens nach Kedde bestimmt. Die Färbung erscheint nach ca. 1 Min.; die Gehaltsabschätzung erfolgt durch Vergleich der Farbintensität mit bekannten Mengen Convallatoxin. In den Gemischen II, III und IV steigt der R_F -Wert mit der Wasserlöslichkeit der Glykoside an, bei Gemisch I kehren sich die Verhältnisse teilweise um, während in V die hydroxyl- und zuckerreichsten Verbindungen am wenigsten wandern.

Die nachfolgende Tabelle gibt einige R_F -Werte in den angegebenen Lösungsmitteln für verschiedene Cardenolid-Derivate wieder:

Substanz	$R_F \cdot 100$ Gemisch				
	I	II	III	IV	V
Strophanthidin	83	—	21	—	—
Strophanthidol	—	—	25	—	—
Anhydro-strophanthidin .	21	—	—	—	—
Anhydro-strophanthidol .	23	—	—	—	—
k-Strophanthin	—	—	100	82	46
k-Strophanthosid	—	—	100	—	15
Ouabagenin	—	—	—	—	62
Ouabain	—	—	100	86	44

Die letzten beiden Werte nach Privat-Mitteilung von Dr. Snatzke in unserem Institut.

Glykosid C₂ (Majalosid): Dieses Glykosid (39 mg) kristallisierte aus der Fraktion 13 der Aluminiumoxyd-Chromatographie. Es wurde aus Methanol-Aceton-Äther mehrmals umkristallisiert und 21 mg rein in Form dichter Drusen aus dünnen Prismen erhalten. Es schmolz bei 174–177°; $[\alpha]_D^{18}$: $-10.1^\circ \pm 4^\circ$ (Methanol).

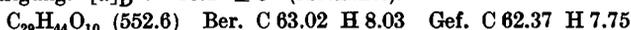


Nach der Spaltung in unten beschriebener Weise wurden als Zucker Rhamnose und Glucose bestimmt.

Glykosid C₃ (Convallatoxin): Dieses Glykosid (103 mg) kristallisierte aus den Fraktionen 15–17 der Aluminiumoxyd-Chromatographie. Es schmolz bei 236–242°; $[\alpha]_D^{18}$: $-0.8^\circ \pm 2^\circ$ (Methanol). Der Misch-Schmelzpunkt mit authentischem Convallatoxin ergab keine Erniedrigung.

Nach der Säurespaltung ließen sich Anhydro-strophanthidin und Rhamnose papierchromatographisch durch den R_F -Wert und bei ersterem auch noch durch die Färbung mit konz. Schwefelsäure bestimmen.

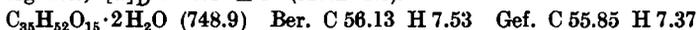
Glykosid C₄ (Convallatoxol): Convallatoxol (71 mg) kristallisierte aus den Fraktionen 23 und 24 der Aluminiumoxyd-Chromatographie. Aus Methanol-Aceton-Äther wurden nach mehrmaligem Umkristallisieren 49 mg Drusen aus dünnen, nadelförmigen Prismen erhalten, die bei 170–172° schmolzen. Der Misch-Schmelzpunkt mit aus Convallatoxin durch Reduktion mit NaBH₄ hergestelltem Convallatoxol ergab keine Schmelzpunktserniedrigung. $[\alpha]_D^{18}$: $-10.4^\circ \pm 3^\circ$ (Methanol).



Die Säurespaltung lieferte Rhamnose, die papierchromatographisch nachgewiesen und Anhydro-strophanthidol, das durch den R_F -Wert und die Schwefelsäurefärbung charakterisiert wurde.

Isolierung von Convallosid: 100 g Amberlit I R-4-B wurde auf einer Nutsche je 6 mal gewaschen mit 2 n Essigsäure, Wasser und 2 n Ammoniak (je 100 ccm) und dann gründlich mit Wasser ausgewaschen. Anschließend wurde der Ionenaustauscher in eine Säule gefüllt und 1 g Chloroform/Äthanol-Extrakt (1:1) aus den Blättern in wenig Wasser gelöst aufgebracht. Die Elution erfolgte mit Wasser und es wurden Fraktionen von 100 ccm aufgefangen. Das Erscheinen von Cardenolid-glykosiden im Durchlauf wurde mit Hilfe der Kedde-Reaktion bestimmt. Die positiv reagierenden Fraktionen wurden 5 mal mit je 100 ccm Chloroform/Äthanol (2:1) ausgeschüttelt und der Extrakt i. Vak. zur Trockene gedampft.

Aus der zweiten Kedde-positiven Fraktion kristallisierten aus Methanol/Äther 21 mg, die, in gleicher Weise umkristallisiert, 14 mg reines Convallosid in Nadeln vom Schmp. 201–205° ergaben; $[\alpha]_D^{18}$: $-9.4^\circ \pm 3^\circ$ (Methanol).



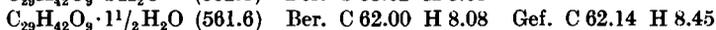
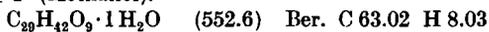
Die Mikrospaltung lieferte Anhydro-strophanthidin sowie Rhamnose und Glucose im Verhältnis 1:1. Der Nachweis wurde durch Papierchromatographie geführt. Mit dieser Methode erwiesen sich Convallosid-acetat im R_F -Wert auch mit authentischen Präparaten von Reichstein als identisch.

Isolierung von Glykosid A (Vallarotoxin) und Glykosid D₁ (Convallosid) durch präparative Papierchromatographie: Auf einem Bogen des Papiers der Firma Macherey & Nagel Nr. 61 (50 mal 50) wurden 12 cm vom oberen Rand im Abstand von 0.5 cm je 1 mg Chloroform/Äthanol-Extrakt (9:1) bzw. (1:1) in möglichst konzentrierter methanol. Lösung aufgetragen. Der Bogen war oben und unten an Glasstäben befestigt. Dann wurde der Bogen gleichmäßig mit wassergesättigtem Pentanol eingesprüht und das Chromatogramm in einem geschlossenen Behälter mit pentanogesättigtem Wasser absteigend entwickelt.

Der Bogen wurde an der Luft getrocknet und 3 bis 4 senkrechte 0.5 cm breite Streifen aus dem Chromatogramm geschnitten, der Ort der Glykoside auf dem Streifen wurde

durch die Reaktion nach Kedde sichtbar gemacht und entsprechende Zonen aus dem Hauptchromatogramm herausgeschnitten. Die einzelnen Fraktionen wurden aus dem Papier im Soxhlet-Apparat mit Methanol extrahiert und der Extrakt i. Vak. eingedampft. Dieses Verfahren wurde ein zweites Mal in der Weise wiederholt, daß jede Glykosidfraktion für sich nur mit einer Belastung von 0.5 mg pro 0.5 ccm zur Chromatographie kam. Schließlich wurden die erhaltenen gereinigten Fraktionen an Aluminiumoxyd (Kennzahl 10000) chromatographiert, um auch noch geringe aus dem Papier stammende Verunreinigungen zu entfernen.

Aus der im Papierchromatogramm am langsamsten laufenden Fraktion wurden aus Aceton/Äther nach mehrtägigem Aufbewahren 17 mg eines Kristallisates erhalten, das nach mehrmaligem Umkristallisieren 9 mg reines Glykosid A = Vallarotoxin lieferte. Schmp. 131–132°, danach Festwerden und erneutes Schmelzen bei 160–164°; $[\alpha]_D^{25}$: $-17.7^\circ \pm 4^\circ$ (Methanol).



Die Säurehydrolyse in üblicher Weise lieferte Rhamnose, die papierchromatographisch bestimmt wurde.

Aus der dem Glykosid D₁ = Convallosid entsprechenden Fraktion der Papierchromatographie wurden in entsprechender Weise 2 mg krist. Convallosid erhalten.

Die Fraktionen B, C₁ und E kristallisierten auch nach Papierchromatographie in der oben beschriebenen Weise nicht. Die Säurespaltung von B lieferte Rhamnose und Glucose, von C₁ nur Rhamnose, von E 2 Glucose und 1 Rhamnose. Die Zucker wurden, wie auch bei den anderen Glykosiden, mit Hilfe des Tetrazoliumverfahrens in ihrem gegenseitigen Verhältnis bestimmt.

Zuckerbestimmung: Die Hydrolyse der Glykoside wurde in der üblichen Weise vorgenommen⁷⁾ und der R_F-Wert in 2 Lösungsmittelgemischen bestimmt (Papier Schleicher & Schüll 2043a).

R _F -Werte	Gemisch I	Gemisch II	Gemisch I: Butanol/Pyridin/Wasser 3:1:3 (leichte Phase)
Glucose ...	0.18	0.28	Gemisch II: die gleichen Lösungsmittel im Verhältnis: 6:4:3.
Rhamnose ..	0.42	0.48	

Zur quantitativen Bestimmung der Zucker liefen parallele Chromatogramme mit der zu prüfenden Lösung und mit eingewogenen Zuckermengen des vorher in seiner Natur ermittelten Zuckers auf dem gleichen Papierstreifen. Nach Entwicklung der Farbflücke mit Tetrazoliumchlorid in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 80° wurden gleich große Papierstücke mit den Flecken (6 cm²) herausgeschnitten. Die Flecke wurden mit 5 ccm Pyridin/konz. Salzsäure (9:1) im Reagenzglas eluiert und im Spektrometer unter Kompensation mit einem Blindwert bei 546 m μ gemessen¹⁰⁾.

Fermentative Spaltung von Glykosid E: 10 mg Glykosid E aus der präparativen Papierchromatographie wurden in 10 ccm Wasser gelöst und mit 10 mg Fermentpräparat Luizym (Luitpold-Werke München) versetzt. Nach 5tägigem Aufbewahren unter Toluol wurde die braune Lösung i. Vak. auf 2 ccm eingengt und mit 20 ccm Äthanol versetzt. Es wurde aufgekocht und die Lösung durch eine Glasfritte filtriert. Das Filtrat wurde 3 mal mit je 3 ccm Chloroform/Äthanol (2:1) ausgeschüttelt. In der verbleibenden wäbr. Lösung wurde die Glucose papierchromatographisch bestimmt. In der Chloroformphase wurden Convallatoxin und Convallosid papierchromatographisch durch den R_F-Wert und die Schwefelsäurefärbung nachgewiesen.

¹⁰⁾ K. Wallenfels, E. Berndt u. G. Limberg, Angew. Chem. **65**, 581 [1953].