

Shashi Om Dayal Bhatnagar und Maheshwari Prasad Khare

Herzwirksame Glykoside aus *Melodinus monogynous* Roxb.

Aus dem Chemistry Department, Lucknow University, Lucknow, Indien

(Eingegangen am 24. Januar 1967)



Aus den Wurzeln von *Melodinus monogynous* wurden neun Butenolide rein isoliert, acht davon in kristallisierter Form. Medigenin und Gynin zeigten herzanregende Wirkung.



Medizinisch interessante Pflanzenarten der Gattung *Nerium* sind in Indien weit verbreitet. *Melodinus monogynous* (= *Nerium piscidium*) ist eine hohe Kletterpflanze mit milchigem Saft (Latex), die in Sikkim und Assam häufig vorkommt. Die Pflanze ist toxisch¹⁾. Eingeborene verwenden die dicken, bitteren und faserigen Wurzeln als Fischgift²⁾. Nach früheren Untersuchungen³⁾ enthalten die Wurzeln ein Glykosid und Sterine.

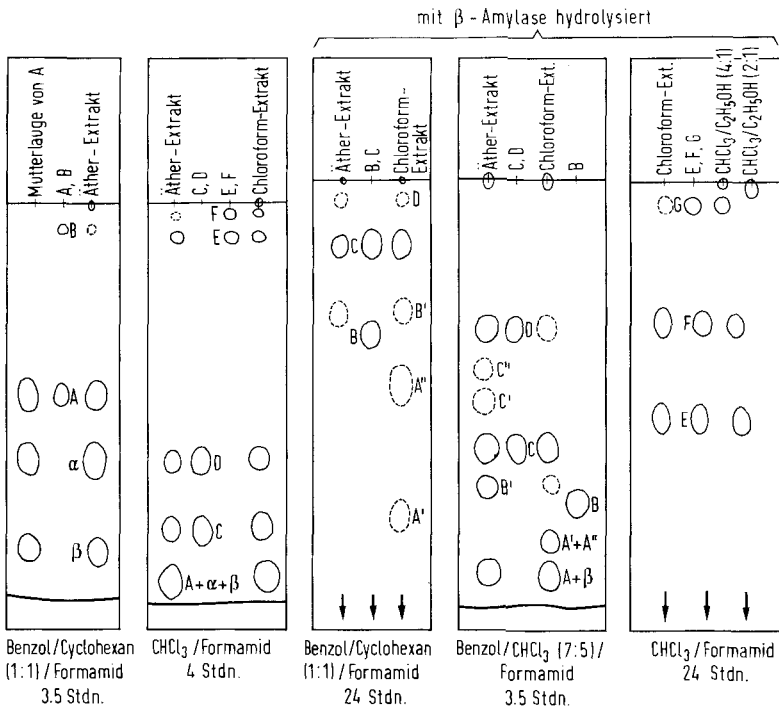
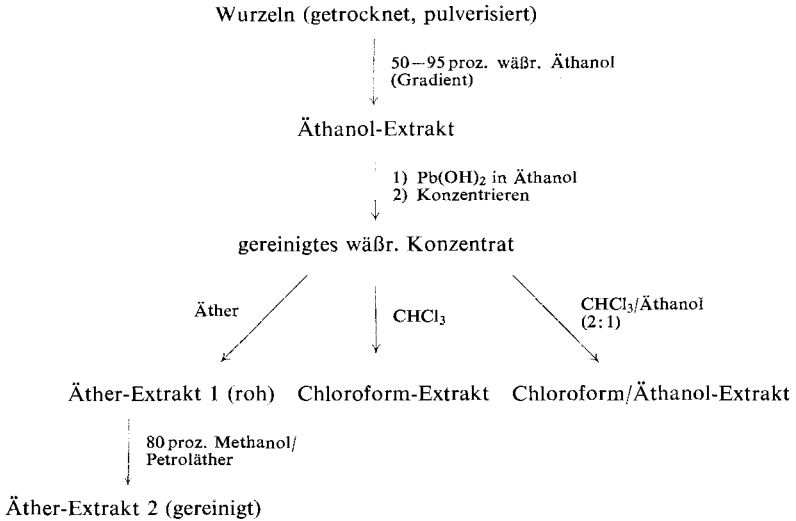
Bei vorläufigen Untersuchungen nach der Methode von Reichstein und Abisch⁴⁾ fanden wir, daß die Wurzeln reich an Kedde-positiven^{5a)} Verbindungen sind. Es war deshalb von Interesse, die Wurzeln dieser Pflanze nach Cardenoliden vom Digitalis/Strophanthus-Typ genauer zu untersuchen.

Extraktion und Isolierung

6.5 kg getrocknete pulverisierte Wurzeln extrahierten wir erschöpfend mit 50 bis 95proz. wäßr. Äthanol (siehe Extraktionsschema). Nach Entfernen der Tannine mit Bleihydroxid⁶⁾ wurde weiter in Äther-, Chloroform- und Chloroform/Äthanol-Extrakte zerlegt.

In den erhaltenen Fraktionen ließen sich papierchromatographisch insgesamt neun verschiedene Kedde-positive^{5a)} Flecke nachweisen, die nach steigender Polarität mit β , α und A–G bezeichnet wurden (Tab. 1, Abbild.).

-
- ¹⁾ B. N. Sastri, Wealth of India, I. Edit., Vol. VI., S. 335, Council of Scientific and Industrial Research publication, New Delhi 1962.
 - ²⁾ R. N. Chopra, I. C. Chopra, K. L. Handa und L. D. Kapur, Indigenous Drugs of India, II. Edit., S. 587, V. N. Dhur & Sons, Calcutta 1958.
 - ³⁾ S. K. Chatterjee, M. L. Dhar und V. N. Sharma, J. sci. ind. Res. [New Delhi] **13B**, 546 (1954); S. K. Chatterjee, M. L. Dhar und Nitya Anand, ebenda **18B**, 262 (1959).
 - ⁴⁾ T. Reichstein und E. Abisch, Helv. chim. Acta **43**, 1844 (1960).
 - ^{5a)} D. L. Kedde, Dissertat., Univ. Leyden 1946; ^{5b)} I. E. Bush und D. A. H. Taylor, Biochem. J. **52**, 643 (1952).
 - ⁶⁾ T. Reichstein, J. v. Euw, H. Hess und J. Speiser, Helv. chim. Acta **34**, 1821 (1951).



Papierchromatographie verschiedener Extrakte auf Papier Whatman No.1⁷⁾. Das mit Aceton/Formamid (3:1) imprägniertes Papier wurde soweit getrocknet, bis die Gewichtszunahme 33% betrug. Nach absteigender Entwicklung wurden die Flecke mit dem Kedde-Reagenz⁵⁾ sichtbar gemacht

Tab. 1. Substanzmengen in den nach dem Fraktionierungsschema erhaltenen Extrakten (Einsatz 6.5 kg getrocknete Wurzeln)

-Extrakt	Gewicht (g)	% Ausb.	Kedde-positive ^{5a)} Bestandteile auf dem Papierchromatogramm
Äther- 1 (roh)	2.25	0.033	—
Äther- 2 (gereinigt)	2.08	0.032	β , α , A, B, C, D, E, F
Chloroform-	2.10	0.032	(A), (B), (C), D, E, F, G
Chloroform/Äthanol(2: 1)-	2.76	0.042	keine Auftrennung

Bestandteile des Äther-Extrakts

Aus dem rohen Äther-Extrakt 1 entfernten wir mit Methanol/Petroläther fettartige Substanzen. Der erhaltene Äther-Extrakt 2 (gereinigt) lieferte nach der Chromatographie an Aluminiumoxid⁸⁾ kristallisierte Verbindung A. Die anschließenden Fraktionen ergaben nach Rechromatographie an Al₂O₃ bzw. Silicagel reines kristallisiertes C und D. Präparative Papierchromatographie⁹⁾ erlaubte die Abtrennung der Substanzen α und β von A, Verteilungschromatographie¹⁰⁾ an Celit 535 die Gewinnung von E und F.

Bestandteile des Chloroform-Extrakts

Durch Verteilungschromatographie an Celit 535 erhielten wir Fraktionen mit reinen Substanzen B, E, F und G sowie Mischungen C + D und D + E. G kristallisierte direkt, B, E und F erst nach weiterer Chromatographie an Silicagel.

Inhaltsstoffe des Chloroform/Äthanol(2: 1)-Extraktes

Papier- und dünnschichtchromatographische Trennversuche mit den für polare Cardenolide verwendeten Lösungsmittelsystemen¹¹⁾ waren nicht erfolgreich. Wir hydrolysierten deshalb den Extrakt enzymatisch¹²⁾ mit β -Amylase. Dieser Ansatz konnte mit verschiedenen Lösungsmitteln fraktioniert werden. Unter den präparativ nicht weiter aufgearbeiteten, papierchromatographisch nachgewiesenen Substanzen befanden sich fünf neue Verbindungen: A', A'', B', C' und C'' (Tab. 2).

⁷⁾ O. Schindler und T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **34**, 108 (1951); A. Hunger und T. Reichstein, ebenda **37**, 680 (1954); E. v. Arx und R. Neher, ebenda **34**, 108 (1956); F. Kaiser, *Chem. Ber.* **88**, 556 (1955).

⁸⁾ T. Reichstein und C. W. Shoppee, *Discuss. Faraday Soc.* **7**, 305 (1945).

⁹⁾ E. v. Arx und R. Neher, *Helv. chim. Acta* **39**, 1664 (1956).

¹⁰⁾ H. Lichti, Ch. Tamm und T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **39**, 1914 (1956).

¹¹⁾ H. H. Jäger, O. Schindler, E. Weiss und T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **48**, 202 (1965); J. M. do Nascimento jr., Ch. Tamm, H. Jäger und T. Reichstein, ebenda **47**, 1775 (1964); P. Mühlradt, E. Weiss und T. Reichstein, ebenda **47**, 2164 (1964); A. R. Manzetti und T. Reichstein, ebenda **47**, 2303 (1964).

¹²⁾ R. Rees, O. Schindler und T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **42**, 1025 (1959).

Tab. 2. Hydrolyse des Chloroform/Äthanol(2 : 1)-Extraktes mit β -Amylase und Fraktionierung des Ansatzes durch aufeinanderfolgende Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Substanzmenge (mg)	papierchromatograph. Nachweis von
Äther	71	β , A, B', C, C', C'', D, (E), (F)
Chloroform	234	(β), A, A', A'', B', C, D, E, F, (G)
Chloroform/Äthanol (4 : 1)	1.02	E, F, (G)
Chloroform/Äthanol (2 : 1)	542	keine Trennung

Isolierte Verbindungen

Außer B waren alle anderen acht isolierten Substanzen noch unbekannt. Wir nannten sie Jaintigenin (β), Pisigenin (α), Medigenin (A), Harinin (C), Jaintin (D), Medinin (E), Gynin (F) und Pisidin (G). Ein UV-Absorptionsmaximum zwischen 213 und 216 m μ (log ϵ 4.0—4.2) in allen Substanzen läßt auf einen Butenolid-Ring (α . β -ungesättigtes γ -Lacton) schließen. Auch das IR-Spektrum zeigt typische Butenolid-Banden, die zusammen mit weiteren Eigenschaften Tab. 3 zu entnehmen sind.

Jaintigenin, Pisigenin und Medigenin sind Aglykone, Harinin, Jaintin, Medinin, Gynin und Pisidin Glykoside.

Verbindung B wurde durch Schmp., Misch-Schmp., papierchromatographischen Vergleich und Herstellung des *O*-Acetyl-Derivats als Digitoxigenin identifiziert.

Das neue Butenolid Medigenin enthält nach Analyse und Massenspektrum sowie Analyse seines *O*-Acetyl-Derivats 20 C-Atome (C₂₀H₃₀O₃).

Durch Hydrolyse von Mikromengen der Glykoside nach *Mannich*¹³⁾ und Papierchromatographie versuchten wir, Zucker und Aglykone zu identifizieren. Harinin ist danach das Rhamnosid eines nicht identifizierten Aglykons. Jaintin und Gynin enthalten ebenfalls beide Rhamnose und als Aglykone Jaintigenin bzw. Gitoxigenin. Glucose als Zuckeranteil ist in Medinin und Pisidin neben Medigenin und Pisigenin als Aglykone enthalten.

Biologische Aktivität

Vier der isolierten Verbindungen prüften wir in folgenden Anordnungen auf ihre cardiotonische Aktivität: a) auf das mit Ringer-Lösung durchströmte Froschherz, b) auf das mit Ringer-Lockes-Lösung durchströmte Säugetierherz (Kaninchen) mit dem Apparat nach Anderson.

Medigenin, sein *O*-Acetat und Gynin waren herzaktiv. Alle drei Verbindungen zeigten gegenüber dem isolierten Säugerherzen einen positiven inotropen Effekt, die beiden ersten einen negativen chronotropen Effekt. Medinin jedoch war inaktiv.

¹³⁾ C. *Mannich* und G. *Siewert*, Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 737 (1942); E. *Weiss*, O. *Schindler* und T. *Reichstein*. Helv. chim. Acta **41**, 736 (1958).

Tab. 3. Eigenschaften der isolierten Verbindungen

Verbindung	Molekular-Peak (m/e)	Summenformel (Mol.-Gew.)	Schmp. $[\alpha]_D^{25}$	λ_{\max} in $m\mu$ (log ϵ)	Butenolid-IR-Banden (cm^{-1})	Feigelt-Test (3)	Fluoreszenz-I est mit 84proz. Phosphor-Chlorsäure	Zusammensetzung der Verbindung
β Jaintigenin (neu)	—	$C_{20}H_{26}O_6$ (362.4)	—	213 (4.19)	—	—	—	Genin
α Pisigenin (neu)	356	$C_{23}H_{32}O_3$ (356.6)	101° -10°	213 (4.20)	3049, 1782, 1740 (s), 1647	—	—	Genin
A Medigenin (neu)	318	$C_{20}H_{30}O_3$ (318.5)	168° -45°	214 (4.14)	3080, 1795, 1730 (s), 1628	—	blaßblau	Genin
Mono-O-acetylmedigenin	360	$C_{22}H_{32}O_4$ (360.6)	97 — 99° -48°	214 (4.14)	3075, 1783, 1765 (s), 1740 (s), 1645	—	—	—
B Digitoxigenin	—	$C_{23}H_{34}O_4$ (374.5)	246° $+18^\circ$	216 (4.18)	3050, 1780, 1740 (s), 1630	—	grün	Genin
C Harinin (neu)	446 = M-44	$C_{28}H_{42}O_7$ (490.6)	228 — 232° $+56^\circ$	216 (4.08)	1733 (s), 1712, 1696 (s)	+	grünlich gelb	Glykosid (Rhamnose + nichtidentif. Genin)
D Jaintin (neu)	—	$C_{32}H_{46}O_{14}$ (654.7)	98 — 100° -26°	213 (4.12)	1785, 1738 (s), 1616	+	—	Glykosid (Jaintigenin + Rhamnose)
E Medinin (neu)	—	$C_{32}H_{50}O_{13}$ (642.8)	118 — 124° -26°	213 (4.09)	1750, 1632	+	blaßblau	Glykosid (Medigenin + Glucose)
F Gynin (neu)	—	$C_{29}H_{44}O_9 \cdot 1.5 H_2O$ (563.7)	182 — 184° -24°	214 (4.15)	1777, 1733 (s), 1615	+	leuchtend blau	Glykosid (Gritoxigenin + Rhamnose)
G Pisidin (neu)	—	$C_{29}H_{42}O_8 \cdot H_2O$ (536.7)	222 — 225°	214 (4.02)	1780, 1748 (s), 1640	+	—	Glykosid (Pisigenin + Glucose)

Herrn Dr. R. Neher, Ciba, Basel, danken wir für die Hilfe bei den Mikroanalysen, Herrn Dr. M. Barbier, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Paris, für die Aufnahme der Massenspektren und Dr. R. M. Srivastava, Brown University, USA, für die Aufnahme der IR-Spektren. Besonderen Dank schulden wir Herrn Direktor Dr. M. L. Dhar, Central Drug Research Institut, Lucknow, für die Ermöglichung der Pflanzenextraktionen und Herrn Prof. K. P. Bhargava, Pharmacology Department, King George's Medical College, Lucknow, für die Bestimmung der biologischen Aktivitäten.

Beschreibung der Versuche

Alle Schmp. bestimmten wir auf dem Kofler-Block. Die zur Messung der spezif. Drehung und Aufnahme der Spektren eingesetzten Substanzen wurden 2 Stdn. bei 100° i. Vak. über P₄O₁₀ getrocknet. Die UV-Spektren in 95proz. Äthanol nahm man mit dem Beckman Spektrophotometer, die IR-Spektren in KBr mit dem Infracord No. 337 auf. Zur Messung der spezif. Drehung diente ein Schmid-und-Haensch-Polarimeter, $c = 1.0$ in Methanol. Für die Säulenchromatographie⁸⁾ setzten wir neutrales Aluminiumoxid (Merck) und Silicagel (British Drug House) ein. Zur Sichtbarmachung der Flecke bei der Papierchromatographie für Cardenolide⁷⁾ diente das Reagens nach Kedde⁵⁾ sowie die Fluoreszenz mit Phosphorsäure¹⁴⁾ und Chloramin T¹⁵⁾. Zucker wurden mit Anilinththalat¹⁶⁾ und mit Hilfe der Feigel-Reaktion¹⁷⁾ nachgewiesen. Laufmittel für die Papierchromatographie: Für Aglykone Benzol/Cyclohexan (1:1), gesätt. mit Formamid, und Benzol/Chloroform (7:5), gesätt. mit Formamid, für Zucker Butanol, gesättigt mit Wasser. Für die Farbreaktion mit 84proz. Schwefelsäure¹⁸⁾ wurden ca. 0.5 mg Substanz auf eine weiße Tüpfelplatte gegeben, schnell mit einem Tropfen der Säure verrieben und im bedeckten Zustand bei Raumtemp. (28°) stehengelassen. 8 Stdn. lang wurde der Farbwechsel verfolgt.

Extraktion der Wurzeln

6.5 kg getrocknete und pulverisierte Wurzeln *) wurden durch Perkolation mit Äthanol ansteigender Konzentration (50–95proz., je 8 l, stufenweise um 5% ansteigend) bei Raumtemp. erschöpfend extrahiert.

Nach Eindampfen der vereinigten Extrakte bei 50–60° unter vermindertem Druck auf 2 l entfernte man die Tannine durch 30 Min. Schütteln auf der Maschine mit einer Suspension von frisch dargestelltem Bleihydroxid⁶⁾ (aus 5 kg Bleiacetat) in 2 l Äthanol. Die Suspension wurde dann durch eine 3 cm dicke Schicht Celit filtriert, das Filtrat schnell mit 2*n* H₂SO₄ auf pH 6 gebracht und das Waschen der Filterschicht mit 50proz. Äthanol fortgesetzt, bis der Kedde-Test negativ war. Man konzentrierte die vereinigten Filtrate bei vermindertem Druck unterhalb 60° auf 1.5 l (Lösung A) und extrahierte dann 5 mal mit je 1 l Äther. Jede der Fraktionen wurde nacheinander mit 100 ccm Wasser, zweimal mit 100 ccm 2*n* Na₂CO₃ und wieder zweimal mit je 100 ccm Wasser gewaschen. Die vereinigten Ätherfraktionen wurden über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne verdampft (= Äther-Extrakt 1 (roh)).

*) Gesammelt in Assam und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. S. Ray, Botaniker in Shillong.

14) A. Petit, M. Pesez, P. Bellet und G. Amiard, Bull. Soc. chim. France (5) **17**, 288 (1950).

15) K. B. Jensen, Acta pharmacol. toxicol. **9**, 99 (1953); C. A. **48**, 2322b (1954).

16) S. M. Partridge, Nature [London] **164**, 443 (1949).

17) F. Feigel, Spot tests, Organic Applications, IV. Edit., Vol. II, S. 289, Elsevier Publishing Company, London 1954.

18) J. v. Euw und T. Reichstein, Helv. chim. Acta **31**, 883 (1948).

Lösung A schüttelte man weiterhin 5 mal mit je 1 l Chloroform und anschließend 5 mal mit je 1 l Chloroform/Äthanol (2 : 1), wusch jede Fraktion mit Wasser, Na_2CO_3 und Wasser wie oben, trocknete und dampfte ein. Ausbeuten s. Tab. 1.

Aufarbeitung des Äther-Extraktes

2.25 g des oben erhaltenen Ätherrückstandes (Äther-Extrakt 1) wurden in 50 ccm 80proz. Methanol aufgenommen, die Lösung 3 mal mit je 30 ccm Petroläther (40–60°) ausgeschüttelt, die Petrolätherschicht nach einmaligem Schütteln mit 80proz. Methanol über Natriumsulfat getrocknet und verdampft. Der Rückstand gab einen negativen Kedde-Test. Die vereinigten methanol. Lösungen konzentrierten wir unter vermindertem Druck, extrahierten dann 5 mal mit je 25 ccm Chloroform, trockneten die organische Phase über Natriumsulfat und verdampften i. Vak. zur Trockne. Ausb. 2.08 g (Äther-Extrakt 2 (gereinigt)).

Chromatographie 1: 2.07 g aus dem „gereinigten Äther-Extrakt“ (enthaltend β , α , A, B, C, D, E und F) wurden entsprechend Tab. 4 an 60 g Aluminiumoxid chromatographiert.

Tab. 4. Chromatographie 1: 2.07 g aus dem „gereinigten Äther-Extrakt“ an 60 g Aluminiumoxid (Fraktionen zu 250 ccm)

Frakt. Nr.	Lösungsmittelsystem	mg *)	Rückstand d. Eluats Flecke **)	Kristalle	weitere Untersuchung
1–3	Benzol/ CHCl_3 (3 : 2)	128	(—)	—	verworfen
4–8	Benzol/ CHCl_3 (3 : 2)	152	(A), (B)	198 mg aus Aceton/ Petroläther, Schmp. 168°	Mutterlauge benutzt für Chromatographie 2
9–13	Benzol/ CHCl_3 (1 : 3)	246	A, (B)		
14–18	Benzol/ CHCl_3 (1 : 9)	149	(B), C, (D)		
19–20	CHCl_3	6	(B), (C), (D)	—	
21–25	CHCl_3	60	(B), (C), (D) E, (F)	—	Chromatographie 4
26–30	$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (99 : 1)	41	(D), E, F	—	
31–33	$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (98 : 2)	16	E, F	—	
34–35	$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (97 : 3)	20	E, F	—	
36–38	$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (96 : 4)	25	E, F	—	
39–44	$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95 : 5)	184	E, F	—	
45–60	$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (90 : 10)	479	E, F	—	

*) amorph. **) auf dem Chromatogramm.

Chromatographie 2, Gewinnung von A: Die Mutterlauge der Fraktionen 4–13 von Chromatographie 1 (190 mg) gaben wir auf eine Säule mit 6 g Aluminiumoxid und eluierten 25 Fraktionen zu 20 ccm. Die vereinigten Rückstände der Fraktionen 14–18 (Benzol/Chloroform 1 : 3) und 19–25 (Chloroform) (zusammen 79 mg) gaben aus Aceton/Petroläther 56 mg kristallisiertes A, Schmp. 168°. Die mit Benzol eluierten Fraktionen 6–8 und mit Benzol/Chloroform (1 : 1) erhaltenen Frakt. 9–13 (71 mg β , α und A enthaltend) wurden durch die präparative Papierchromatographie I aufgetrennt.

Chromatographie 3, Gewinnung von C: Die Frakt. 14–18 von Chromatographie 1 (149 mg) wurden an 8 g Aluminiumoxid rechromatographiert (28 Frakt. zu 20 ccm). Frakt. 10–16 mit Benzol/Chloroform (1 : 3) gaben 51 mg C als Rückstand. Die Frakt. 6–9 und 17–28 mit (B), C, (D) bzw. C, D wurden in die präparative Papierchromatographie II eingesetzt.

Chromatographie 4, Gewinnung von D: Man chromatographierte die vereinigten Fraktt. 21–60 von Chromatographie 1 (825 mg) noch einmal an 30 g Silicagel (45 Fraktt. zu 120 ccm). Die mit Chloroform eluierten Fraktt. 22–27 gaben 29 mg Rückstand; aus Aceton/wassergesätt. Äther 8 mg farblose Nadeln von D, Schmp. 98–100°. Die Fraktt. 28–32 (Chloroform/Methanol, 1–2% Methanol) mit (C), D, E setzte man für die präp. Papierchromatographie III, die Fraktt. 33–45 (Chloroform mit 2–10% Methanol) mit (D), E, F (604 mg) für die Verteilungschromatographie 5 ein.

Verteilungschromatographie 5: 604 mg Rückstand der Fraktt. 33–45 von Chromatographie 4 wurden an Celit 535 mit Formamid als stationärer Phase und Benzol/Chloroform (3 : 7) bzw. Chloroform als mobiler Phase chromatographiert: Zur Suspension von 60 g gereinigtem und getrocknetem Celit 535 in 300 ccm Benzol/Chloroform (3 : 7) gab man langsam unter Rühren 40 g reines Formamid, schüttelte dann 1 Stde. auf der Maschine und füllte den erhaltenen Brei unter Stampfen gleichmäßig in eine 4 × 50-cm-Säule. Fraktt. wurden alle 12 Stdn. bei 20 ccm/Stde. gesammelt.

Jede Frakt. wurde unter vermindertem Druck eingedampft, der mit Formamid verunreinigte Rückstand 3 mal mit Chloroform extrahiert, die organische Schicht einmal mit Wasser, einmal mit 2*n* Na₂CO₃ und 3 mal mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockne verdampft. Einzelheiten siehe Tab. 5.

Tab. 5. Verteilungschromatographie 5: 604 mg Substanz an 60 g Celit

Frakt. Nr.	Lösungsmittel	Eluat-Rückstand mg *)	Flecke **)	weitere Aufarbeitung
1–10	Benzol/CHCl ₃ (3 : 7)	69	Kedde-negativ	verworfen
11–12	Benzol/CHCl ₃ (3 : 7)	8	B, C, D	präp. Papierchromatogr. II
13–17	Chloroform	45	D, E	präp. Papierchromatogr. III
18–22	Chloroform	30	Kedde-negativ	verworfen
23–28	Chloroform	30	E	Chromatographie 6
29–69	Chloroform	402	E, F	Chromatographie 8
70–81	Chloroform	54	F	Chromatographie 7
82–90	Chloroform	63	Kedde-negativ	verworfen

*) amorph. **) auf dem Chromatogramm.

Chromatographie 6, Gewinnung von E: Da aus den E enthaltenden Fraktt. 23–28 von Chromatographie 5 keine Substanz kristallisierte, wurde der Rückstand (30 mg) an 3 g Silicagel chromatographiert. Das mit Chloroform in 10 Fraktt. zu 3 ccm eluierte amorphe E (18 mg) kristallisierte aus Chloroform/wassergesätt. Äther in farblosen Rhomben mit Schmp. 118–124°.

Chromatographie 7, Gewinnung von F: Auch das in den Fraktt. 70–81 von Chromatographie 5 enthaltene F (54 mg) kristallisierte nicht. Durch Rechromatographie an 6 g Silicagel mit 12 Fraktt. zu 10 ccm mit Chloroform und Chloroform/Methanol (99 : 1) erhielt man 30 mg F, das aus Isopropylalkohol/Wasser in farblosen Körnchen vom Schmp. 182–184° kristallisierte, Ausb. 12 mg.

Aufarbeitung des Chloroform-Extraktes

Chromatographie 8: Der die polaren Substanzen D, E, F und G enthaltende Rückstand des Chloroform-Extraktes (2.10 g) wurde, gemischt mit dem Rückstand der Fraktt. 29–69

(402 mg) aus Chromatographie 5, an 250 g mit Formamid imprägniertem Celit 535 verteilt (Chloroform/Formamid als mobile Phase). Vorbereitung der 100×4 ccm-Säule wie bei Chromatographie 5. Man sammelte jeweils 480 ccm Eluat in 12 Std. und reinigte jede Frakt. wie bei Chromatographie 5. Einzelheiten s. Tab. 6.

Tab. 6. Chromatographie von 2.10 g Rückstand aus dem Chloroform-Extrakt an 250 g Celit 535 mit Chloroform, gesättigt mit Formamid

Frakt. Nr.	Eluat-Rückstand mg *)	Flecke auf dem Papierchromatogramm	weitere Aufarbeitung
1—5	430	Kedde-negativ	verworfen
6—9	15	B	kristallisierte
10—17	141	Kedde-negativ	verworfen
18—25	26	C, D	präp. Papierchromatographie II
26—40	151	Kedde-negativ	verworfen
41—60	73	E	Chromatographie 9
61—80	154	Kedde-negativ	verworfen
81—120	150	F	Chromatographie 10
121—130	100	Kedde-negativ	verworfen

*) amorph.

Isolierung von Substanz G: Nach Frakt. 120 von Chromatographie 8 zeigten weitere 30 Kedde-negative Frakt., daß Verbindung G auf der Säule verblieb. Man ließ deshalb die Lösungsmittel aus der Säule ablaufen, klopfte die intakte Celit-Säule heraus und zerschnitt sie in mehrere Segmente. Das oberste Kedde-positive Segment wurde erschöpfend mit 95proz. Äthanol extrahiert und der filtrierte, i. Vak. eingeengte, Formamid enthaltende Auszug 4mal mit je 10 ccm Chloroform/Äthanol (2 : 1) extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase mit Wasser, 10proz. KHCO_3 -Lösung und zweimal Wasser sowie Trocknen über Na_2SO_4 verdampfte man zur Trockne. Der Rückstand (16 mg) zeigte auf dem Papierchromatogramm nur einen Fleck von Substanz G und kristallisierte aus Äthanol/Wasser mit Schmp. $222-225^\circ$.

Isolierung von B: Man nahm den Rückstand der Frakt. 6—9 von Chromatographie 8 (15 mg) in Chloroform/Äther (1 : 1) auf, filtrierte durch eine 1-ccm-Schicht von Aluminiumoxid und kristallisierte den Rückstand des Filtrats aus Aceton/Äther: 8 mg farblose Nadeln, Schmp. 246° . Die Mutterlauge (3 mg) wurde zur Acetylierung eingesetzt.

Chromatographie 9, Gewinnung von E: Das in den Frakt. 41—60 von Chromatographie 8 enthaltene E kristallisierte nicht. Man chromatographierte deshalb den Rückstand (15 mg) an 8 g Silicagel. Reines E ließ sich mit Chloroform in 8 Frakt. zu 2 ccm eluieren (40 mg) und gab aus Äthanol/Wasser 31 mg farblose Nadeln mit Schmp. $118-124^\circ$.

Chromatographie 10, Gewinnung von F: Die in den Frakt. 81—120 von Chromatographie 8 enthaltenen 150 mg F wurden weiter an 15 g Silicagel gereinigt. Chloroform (15 ccm) und Chloroform/Methanol (98 : 2, 15 ccm) eluieren 80 mg zunächst amorphes F, das jedoch aus Isopropylalkohol/Wasser farblose Körnchen vom Schmp. $182-184^\circ$ ergab.

Präparative Papierchromatographie I—III

Papier Whatman No. 3 bzw. 1, 19×45 cm, wurde mit Aceton/Formamid (3 : 1) imprägniert und dann 15 Min. an der Luft getrocknet, bevor die Substanzen aufgetragen wurden. Nach der Entwicklung entsprechend Tab. 7 schnitten wir einen 0.5 cm breiten Streifen von jeder Seite ab, um darauf mit dem Kedde-Reagenz⁵⁾ die Substanzen zu lokalisieren, schnitten dann die

Substanzzonen aus und in kleine Stücke, die erschöpfend mit warmem Methanol/Wasser (1 : 1), Methanol und schließlich Chloroform extrahiert wurden. Nach Eindampfen der vereinigten Filtrate i. Vak. zog man den wäßr. Rückstand mit Chloroform aus und erhielt aus der in der üblichen Weise gewaschenen organischen Phase Substanzen, die auf dem Papierchromatogramm nur jeweils einen Fleck gaben. Jede Frakt. wurde erneut an Silicagel chromatographiert und die Verbindungen in den Eluat(en) (Tab. 7) durch Lösungsmittelzusatz kristallisiert.

Tab. 7. Präparative Papierchromatographie I—III

Nr.	eingesetzte Fraktionen	Anzahl der verwendeten Papiere	eingesetzte Mischung mg	Chromatographie an Silicagel			
				Lösungsmittelsystem	mg eluiert	Kristalle mg	
I	6—13 (Chromat. 2) Mutterlauge 14—25 (Chromat. 2)	4	80	Benzol/ Cyclohexan (1 : 1), gesätt. mit Formamid	β 3	amorph	
					α 8		3
					A 9		4
II	6—9 (Chromat. 3) Mutterlauge 10—16 (Chromat. 3) 17—28 (Chromat. 3) Mutterlauge 22—27 (Chromat. 4) 11—12 (Chromat. 5) 18—25 (Chromat. 8)	8	200	Benzol/ Chloroform (7 : 5), gesätt. mit Formamid	B 4	2	
					C 8	4	
					D 6	3	
III	13—17 (Chromat. 5) 28—32 (Chromat. 4)	12*)	115	Benzol/ Chloroform (7 : 5), gesätt. mit Formamid	C 6	3	
					D 1	5	

*) Whatman No. 1.

Enzymatische Hydrolyse des Chloroform/Äthanol(2 : 1)-Extraktes

Man löste den Rückstand des Extraktes (2.75 g) in 5.5 ccm Wasser (unter Zugabe einiger Tropfen Methanol), gab eine Suspension von 27.5 mg β -Amylase (E. Merck) in 50 ccm Wasser sowie 10 Tropfen Toluol zu und hielt 20 Tage bei 37°. Dabei schied sich ein viskoser Stoff ab. Man gab 175 ccm Äthanol zu, filtrierte durch eine 2 cm dicke Celit-Schicht, verdampfte den Alkohol unter vermindertem Druck und extrahierte das wäßr. Konzentrat (ca. 60 ccm) je 5 mal mit Äther, Chloroform, Chloroform/Äthanol (4 : 1) und (2 : 1). Die papierchromatographisch ermittelten Substanzen der einzelnen Frakt. zeigt Tab. 2.

Isolierte Verbindungen

Farbreaktionen und andere spezifische Reaktionen sowie UV- und IR-Banden siehe Tab. 3.

Verbindung β (Jaintigenin): Durch präparat. Papierchromatographie I (Tab. 7) wurden 3 mg chromatographisch reines amorphes β erhalten. Alle Kristallisationsversuche scheiterten.

Verbindung α (Pisigenin): Die amorphe, aus präparat. Papierchromatographie I (Tab. 7) erhaltene Substanz gab aus Aceton farblose federförmige Kristalle mit Schmp. 101° und $[\alpha]_D^{25}$: $-10 \pm 2^\circ$. Wegen der geringen Menge konnte die Verbindung nicht analysiert werden. Mol.-Gew. 356 (Massenspektrum).

Verbindung A (Medigenin): 198 mg Kristalle aus Chromatographie 1 kamen aus Aceton/Pentan als farblose Nadeln mit Schmp. 168°; $[\alpha]_D^{25}$: $-45 \pm 2^\circ$. Weitere 56 mg A erhielt man aus Chromatographie 2. Farbreaktion mit 84proz. Schwefelsäure: nach 0 Min. farblos, 5 Min. violett, 10 blaßgrün, 15 orange, 30 violett, 1–8 Stdn. hellviolett. Zur Analyse wurde bei 100°/0.02 Torr über P₄O₁₀ getrocknet.

C₂₀H₃₀O₃ (318.4) Ber. C 75.46 H 9.43 O 15.09
 Gef. C 75.20, 75.23 H 9.60, 9.31 O 14.80
 Mol.-Gew. 318 (Massenspektrum)

O-Acetyl-medigenin: Zu 25 mg *Medigenin* (Schmp. 168°) in 0.5 ccm *Pyridin* gab man 0.4 ccm *Acetanhydrid*, ließ 48 Stdn. bei Raumtemp. stehen, entfernte dann das Pyridin i. Vak., nahm den Rückstand in Chloroform/Äther (1 : 2) auf, wusch je zweimal mit 2*n* HCl, 2*n* Na₂CO₃ und Wasser, trocknete über Na₂SO₄ und verdampfte zur Trockne (20 mg). Aus Cyclohexan 16 mg Körnchen mit Schmp. 98°, $[\alpha]_D^{25}$: $-48 \pm 2^\circ$. Zur Analyse wurde 4 Stdn. bei 50° i. Vak. über P₄O₁₀ getrocknet.

C₂₂H₃₂O₄ (360.7) Ber. C 73.33 H 8.88
 Gef. C 73.20, 72.70 H 8.90, 8.70
 Mol.-Gew. 360 (Massenspektrum)

Verbindung B (Digitoxigenin): Aus Chromatographie 8 farblose Nadeln, Schmp. 246°, $[\alpha]_D^{25}$: $+18 \pm 2^\circ$. Nach 4 Stdn. Trocknen über P₄O₁₀ bei 100° wurde analysiert.

C₂₃H₃₄O₄ (374.5) Ber. C 73.95 H 9.15 Gef. C 73.84 H 9.06

Die Verbindung zeigte auf dem Papierchromatogramm (Benzol/Chloroform (7 : 5), gesätt. mit Formamid) den gleichen *R_F*-Wert wie *Digitoxigenin*, Misch-Schmp. ohne Depression, übereinstimmende IR-Spektren und Farbreaktionen mit Schwefelsäure.

O-Acetyl-digitoxigenin: 3 mg amorpher Rückstand aus der Mutterlauge der Frakt. 6–9 von Chromatographie 8 wurden wie oben mit 0.3 ccm *Pyridin* und 0.3 ccm *Acetanhydrid* 48 Stdn. umgesetzt und aufgearbeitet. Ausb. 3 mg gereinigtes *Acetat*, aus Aceton/Äther 1.5 mg farblose Nadeln vom Schmp. 225°. Keine Schmp.-Depression mit authent. Verbindung, papierchromatographischer Vergleich.

Verbindung C (Harinin): 51 mg aus Chromatographie 3 ergaben aus Methanol/Äther 10 mg farblose Körnchen mit Schmp. 228–232°, $[\alpha]_D^{25}$: $+56 \pm 2^\circ$. Farbreaktion mit 84proz. Schwefelsäure: nach 0 Min. orange-gelb, 5 Min. orange, 10–30 Min. gelb, 1–2 Stdn. hellgelb, 4–8 Stdn. farblos. Zur Analyse trocknete man 4 Stdn. bei 100° über P₄O₁₀ i. Vak.

C₂₈H₄₂O₇ (490.6) Ber. C 68.55 H 8.63 Gef. C 68.40, 68.63 H 8.60, 8.82

Verbindung D (Jaintin): Aus Chromatographie 4 farblose Nadeln mit Schmp. 98–100°, $[\alpha]_D^{25}$: $-26 \pm 2^\circ$. Farbreaktion mit 84proz. Schwefelsäure: 0–10 Min. orange, 15 Min. grünbraun, 1 Stde. gelbbraun, 2 Stdn. hellgrau, 4 Stdn. blaugrau, 8 Stdn. braungrau. Trocknung zur Analyse 4 Stdn. bei 50° i. Vak. über P₄O₁₀.

C₃₂H₄₆O₁₄ (654.7) Ber. C 58.68 H 7.08 Gef. C 58.90 H 7.11

Verbindung E (Medinin): 18 mg farblose Rhomben aus Chromatographie 6 sowie 31 mg aus Chromatographie 9 mit Schmp. 118–124°, $[\alpha]_D^{25}$: $-26 \pm 2^\circ$. Farbreaktion mit 84proz. Schwefelsäure: 0 Min. schmutzig-grün, 5 Min. bis 8 Stdn. hellviolett. Man trocknete zur Analyse i. Vak. bei 100° über P₄O₁₀.

C₃₂H₅₀O₁₃ (642.8) Ber. C 59.81 H 7.78 Gef. C 59.70 H 7.50

Verbindung F (Gynin): Chromatographie 7 ergab 12 mg farblose Körnchen mit Schmp. 182–184° und $[\alpha]_D^{25}$: $-24 \pm 2^\circ$. Weiteres F lieferte Chromatographie 10. Farbreaktion mit 84proz. Schwefelsäure: 0 Min. gelb, 5 orangegelb, 10–15 hellbraun, 30 braun, 1 Stde. gelbbraun, 2 Stdn. graugrün, 4 Stdn. blaugrün, 8 Stdn. braungrün. Gewichtsverlust beim 4stdg. Trocknen i. Hochvak. über P_4O_{10} bei 120° 5.25%, entsprechend $1\frac{1}{2} H_2O$.

$C_{29}H_{44}O_9$ (536.7) Ber. C 64.91 H 8.26 Gef. C 65.39 H 8.46

Verbindung G (Pisidin): 16 mg farblose Nadeln aus Chromatographie 8, Schmp. 222–225°. Beim Trocknen über P_4O_{10} i. Hochvak. (4 Stdn., 100°) verlor die Substanz 4.03% Gewicht, entsprechend 1 H_2O .

$C_{29}H_{42}O_8$ (518.7) Ber. C 67.17 H 8.16 Gef. C 67.27 H 8.35

[43/67]