

von 50 cm³ konz. HCl fällt ein öliges Harz aus, das nach 4stündigem Kochen der Lösung am Rückfluss kristallin erstarrt. Nach dem Abkühlen wird mit konz. NaOH alkalisch gemacht und die gelbe Kristallmasse abgesaugt. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser-Dioxan erhält man 2,5 g (50% d.Th.) der Base vom Smp. 218–238°. Nach fünfmaligem Umkristallisieren aus Dioxan ist das Diamin analysenrein: farblose Stäbchen vom Smp. 251–252° (korr.). An der Luft färbt es sich allmählich gelb.

b) Nach *Erlenmeyer & Menzi*: die Kondensationsreaktion wurde genau nach den Angaben dieser Autoren durchgeführt. Da das Reaktionsprodukt jedoch in konz. HCl nur sehr schwer löslich ist, wurde es zur Aufarbeitung mit 2-n. HCl erwärmt, warm filtriert und das Filtrat mit NaOH alkalisch gemacht. Der ausgefallene gelbliche Niederschlag wurde abgenutscht, sorgfältig getrocknet und zur Entfernung von Schwefel kurz mit CS₂ aufgekocht. Der Rückstand wurde aus Pyridin-Wasser umkristallisiert, mit Äther gewaschen und nochmals umkristallisiert. Die so erhaltene Verbindung erwies sich auf Grund von Smp., Kristallform und Misch-Smp. als identisch mit dem unter a) beschriebenen Präparat.

Die Analysen verdanken wir z.T. dem mikroanalytischen Laboratorium der *CIBA Aktiengesellschaft* (Dr. H. Gysel), z.T. dem mikroanalytischen Laboratorium der organisch-chemischen Anstalt (*E. Thommen*).

SUMMARY.

The synthesis of 5,5'-bithiazole is described.

Universität Basel, Anstalt für anorganische Chemie.

48. Die Glykoside von *Strophanthus intermedius Pax*

2. Mitteilung¹⁾²⁾.

Trennung des Kristallisats Nr. 790.

Glykoside und Aglykone, 105. Mitteilung³⁾

von H. Hegedüs, Ch. Tamm und T. Reichstein.

(15. I. 53.)

Die Samen von *Strophanthus intermedius Pax* sind ausserordentlich glykosidreich. Aus dem nach Fermentierung erhaltenen komplizierten Gemisch von Monoglykosiden liessen sich bisher vor allem Intermediosid und Panstrosid gewinnen¹⁾⁴⁾. In kleiner Menge wurde daraus noch Substanz Nr. 800 isoliert¹⁾⁵⁾, deren Reinheit nicht völlig gesichert ist¹⁾ sowie grössere Mengen eines Kristallisats Nr. 790,

¹⁾ 1. Mitteilung: *J. v. Euw, H. Hess, P. Speiser & T. Reichstein*, *Helv.* **34**, 1821 (1951).

²⁾ Auszug aus der Diss. *H. Hegedüs*, Basel, die demnächst erscheint.

³⁾ 104. Mitteilung: *H. Hauenstein, A. Hunger & T. Reichstein*, *Helv.* **36**, 87 (1953).

⁴⁾ *M. R. Salmon, E. Smith & W. G. Bywater*, *Am. Soc.* **34**, 3824 (1951).

⁵⁾ In grösserer Menge wurde Substanz Nr. 800 aus dem Samengemisch aus Quilengues (Südangola) isoliert. Nach *H. Hess* wächst dort vor allem eine Rasse von *S. intermedius*, die vom typischen *S. intermedius* etwas abweicht, aber auch nicht dem typischen *S. amboensis* (*Schinz*) *Engl. et Pax* entspricht. Vgl. *Ber. Schweiz. Botan. Ges.* **62**, 80 (1952).

das als schwer trennbares Gemisch erkannt wurde. Durch Papierchromatographie liessen sich, je nach Provenienz, 3—5 Stoffe darin nachweisen, unter anderem auch wieder Intermediosid und Panstrosid. Eine Trennung durch Kristallisation gelang nicht, auch Chromatographie an Al_2O_3 war kaum erfolgreich. Etwas bessere Resultate gab ein Vorversuch durch Verteilungschromatographie¹⁾ mit Formamid als stationärer Phase²⁾. Dieses Verfahren hat jedoch praktische Nachteile. Sehr gut bewährte sich aber die Verteilungschromatographie³⁾ mit Wasser als stationärer Phase, wobei wir als Träger Kieselgur⁴⁾ verwendeten, das vorher gut gereinigt wurde. Als mobile Phase dienten Petroläther-Benzol-Gemische, reines Benzol, Benzol-Chloroform-Gemische, reines Chloroform sowie Chloroform-Butanol-Gemische.

Mit diesen Systemen (Einzelheiten siehe exp. Teil) liessen sich sehr viele sonst schwer trennbare Glykosidgemische gut aufteilen. Es ist besonders auch zur Trennung kleiner Substanzmengen geeignet. Ausserdem hat es den Vorteil, dass es meistens auch in solchen Fällen gut brauchbar ist, in denen Al_2O_3 chemische Veränderungen verursacht. Der Nachteil ist, dass es sehr grosse Säulen und relativ viel Zeit benötigt. Im Vergleich zur Adsorptionchromatographie an Al_2O_3 muss das Volumen der Säule mindestens 10mal grösser sein, der Zeitbedarf ist etwa 30fach. — Im exp. Teil wird als Beispiel zuerst die Trennung von Cymaridin und Cymarol beschrieben (Kontrolle durch Papierchromatogramm vgl. Fig. 1), die an Al_2O_3 nur unvollständig gelingt, dann diejenige des Kristallisats Nr. 790 aus *S. intermedius* sowie die der Mutterlauge dieses Kristallisats.

Aus Kristallisat Nr. 790 liessen sich neben Intermediosid und Panstrosid in dieser Weise (vgl. Fig. 3) zwei neue krist. Glykoside isolieren, die wir als Inertosid und Leptosid bezeichnen. 1,5 g Kristallisat 790⁵⁾ lieferte 340 mg (22,7 %) Intermediosid, ca. 516 mg (34,4 %) Inertosid, 111 mg (7,4 %) Leptosid, 26 mg (1,7 %) Panstrosid und 30 mg nicht getrennte Kristallgemische. Aus 2 g Mutterlauge von Kristallisat Nr. 790 wurden analog erhalten (vgl. Fig. 4): 677 mg (33,8 %) Intermediosid, 161 mg (8,0 %) Sarverogenin⁶⁾, 150 mg (7,6 %) Inertosid, 221 mg (11,0 %) Leptosid und 11 mg eines weiteren Stoffes, dessen Reinheit nicht völlig gesichert ist und der vorläufig als Subst. Nr. Heg 13 bezeichnet wird. Fig. 2 zeigt das Verhalten der bisher aus *S. intermedius* isolierten Stoffe im Papierchromatogramm mit Formamid als

¹⁾ *A. J. P. Martin & R. L. M. Synge*, *Biochem. J.* **35**, 91, 1358 (1941).

²⁾ *J. v. Eeuw, H. Hess, P. Speiser & T. Reichstein*, *Helv.* **34**, 1821 (1951).

³⁾ Die Verteilungschromatographie ist zur Trennung von herzaktiven Glykosiden unseres Wissens zuerst von *A. Stoll & W. Kreis*, *Helv.* **34**, 1431 (1951); *A. Stoll, E. Angliker, P. Barfuss, W. Kussmaul & J. Renz*, *Helv.* **34**, 1460 (1951), verwendet worden.

⁴⁾ *S. Bergström, A. Lardon & T. Reichstein*, *Helv.* **32**, 1617 (1949).

⁵⁾ Es wurde ein aus dem Chloroformextrakt isoliertes Präparat verwendet.

⁶⁾ Wahrscheinlich während der Extraktion der Samen aus Intermediosid entstanden.

Beispiele für die Kontrolle durch Papierchromatographie.

Mobile Phase überall entsäuertes Formamid. Die durch senkrechte Striche getrennten Nummern sind nicht auf demselben Papierblatt gelaufen. Angaben über mobile Phase und Versuchsdauer siehe unter jeder Fig.

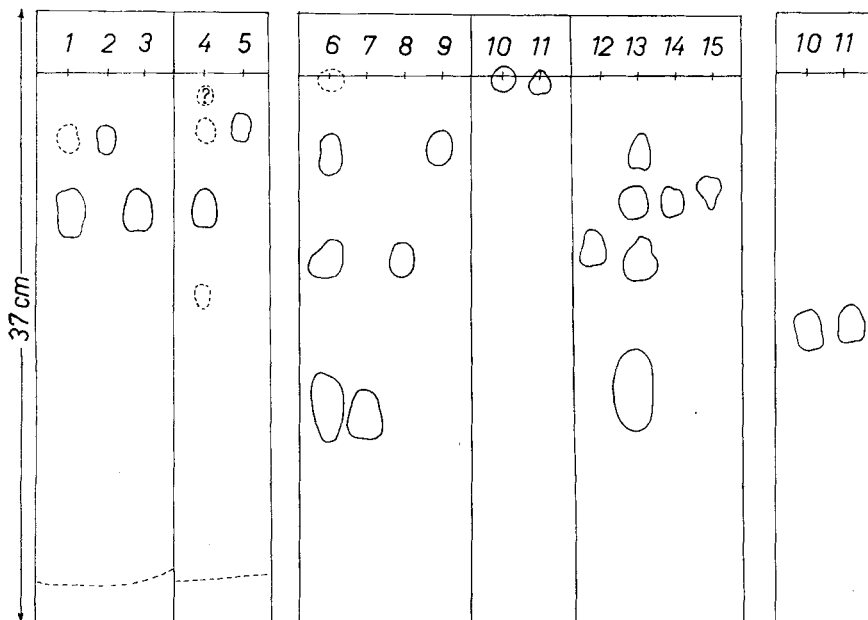


Fig. 1.

Benzol-Chloroform (7:5)

 $4\frac{1}{2}$ Std. $t = 22^\circ$.

Fig. 2a

Benzol-Chloroform (5:7)

7 Std. $t = 22^\circ$.

Fig. 2b

Benzol-Chloroform
(5:7)16 Std. $t = 17^\circ$.

- 1 = 0,06 mg krist. Cymarín, ca. 10% Cymarol enthaltend.
- 2 = 0,06 mg Cymarol.
- 3 = 0,06 mg Cymarín aus Fr. 2—9 (exp. Teil).
- 4 = 0,06 mg Kristallgemisch aus Fr. 10—14 (exp. Teil).
- 5 = 0,06 mg Cymarol aus Fr. 15—17 (exp. Teil).
- 6 = 0,15 mg Kristallisat Nr. 790.
- 7 = 0,03 mg Intermediosid.
- 8 = 0,03 mg Inertosid.
- 9 = 0,03 mg Leptosid.
- 10 = 0,03 mg Panstrosid.
- 11 = 0,03 mg Glykosid Nr. 800.
- 12 = 0,03 mg Glykosid Nr. 795.
- 13 = 0,145 mg Mutterlaugen von Kristallisat Nr. 790 aus *S. intermedius*.
- 14 = 0,03 mg Sarverogenin.
- 15 = 0,03 mg Substanz Nr. Heg 13.

stationärer Phase¹). Zum Vergleich ist auch noch die Laufstrecke von Subst. Nr. 795 eingesetzt worden, die bisher nur aus dem Samengemisch aus Quilengues, aber nicht aus reinem typischem *S. interme-*

¹) O. Schindler & T. Reichstein, Helv. 34, 108 (1951).

dius *Pax* isoliert wurde. In der ersten Mitteilung (l. c.) ist angegeben worden (S. 1823 unten), dass bei der Papierchromatographie von Kristallinat Nr. 790 auch ein Fleck erhalten wurde, dessen Laufstrecke derjenigen von Substanz Nr. 795 entspricht. Wie aus Fig. 2 hervorgeht, ist es jetzt jedoch höchst wahrscheinlich, dass dieser Fleck wenig-

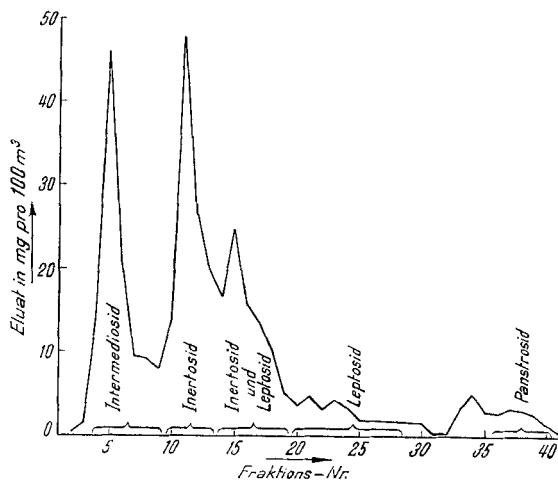


Fig. 3.

Verteilungschromatographie von 1,5 g Kristallinat Nr. 790 aus *Strophanthus intermedius Pax*.

Ruhende Phase: Wasser auf Kieselgur.

Bewegliche Phase: Für Fr. 1—35 Benzol.

Für Fr. 36—42 Benzol-Chloroform und Chloroform.

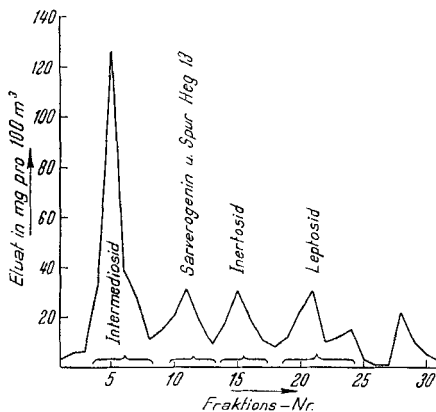


Fig. 4.

Verteilungschromatographie von 2 g Mutterlaugen von Kristallinat Nr. 790 aus *S. intermedius Pax*.

Ruhende Phase: Wasser auf Kieselgur.

Bewegliche Phase: Für Fr. 1—26 Benzol.

Für Fr. 27—31 Benzol-Chloroform.

stens zur Hauptsache nicht von Nr. 795, sondern von Inertosid hervorgerufen war, denn diese zwei Stoffe zeigen im Papierchromatogramm gleiche Laufstrecken, und Inertosid war in dem verwendeten Präparat reichlich enthalten, während Nr. 795 darin bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

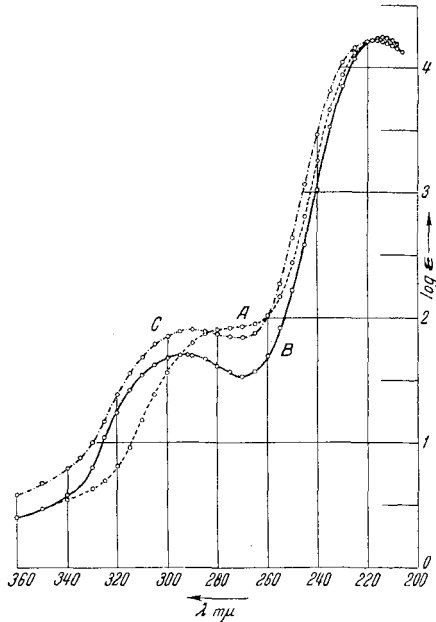


Fig. 5.

Ultraviolett-Absorptionsspektren in Alkohol¹⁾.

- Kurve A: Intermediosid ($C_{30}H_{44}O_{10} = 564,65$). Maximum bei 216 $m\mu$, $\log \epsilon = 4,23$. Schulter bei 270–280 $m\mu$. Beim Sarverosid wurde früher²⁾ versucht, die genaue Lage des niedrigen Maximums zu ermitteln, indem von der Absorption des Sarverosids diejenige des Digitoxigenins abgezogen wurde. Es ergab sich dort (Kurve 4) ein Maximum bei $279 \pm 3 m\mu$ und $\log \epsilon = 1,85$.
- Kurve B: Inertosid ($C_{30}H_{44}O_{10} = 564,65$). Maxima bei 215 $m\mu$, $\log \epsilon = 4,25$; 292 $m\mu$, $\log \epsilon = 1,70$.
- · - · - Kurve C: Leptosid ($C_{30}H_{44}O_{10} = 564,65$). Maxima bei 217 $m\mu$, $\log \epsilon = 4,22$; 290 $m\mu$, $\log \epsilon = 1,90$.

Inertosid gab aus Methanol-Wasser oder aus Aceton-Äther recht scharf bei $159-161^\circ$ schmelzende Nadeln, während aus feuchtem Methanol-Äther oft Kristalle mit Doppel-Smp. $155-168^\circ/227-244^\circ$ erhalten wurden. Leptosid gab aus Aceton-Äther oder Methanol-Äther Würfel vom Smp. $199-202^\circ$, und aus Methanol-Wasser Kristalle, die ähnlich, bei $194-195^\circ$, schmolzen. Die Analysen von Inertosid und

¹⁾ Aufgenommen von Herrn Dr. P. Zoller mit einem „Beckman-Quartz-Spektrophotometer Modell DU“.

²⁾ A. Buzas, J. v. Euw & T. Reichstein, Helv. 33, 465 (1950).

Leptosid passten auf die Formel $C_{30}H_{44}O_{10}$ mit einer Methoxygruppe, was auch mit den Resultaten der hydrolytischen Spaltung übereinstimmte¹). Im UV. zeigen beide Stoffe ähnliche Absorption wie Intermediosid (vgl. Fig. 5, Kurven A, B, C), nur ist bei ihnen das Maximum der Carbonylbande bei 290 bzw. 292 $m\mu$ deutlicher sichtbar. Beide Glykoside zeigen positive *Legal*-Reaktion und positive *Keller-Kiliani*-Reaktion. Bei der Tüpfelprobe mit *Raymond's* Reagens auf Papier gab Inertosid einen violettblauen Fleck, wie er normalerweise mit digitaloiden Lactonen erhalten wird. Leptosid lieferte einen blaugrünen Fleck, was zur Differenzierung im Papierchromatogramm benützt werden kann²). Einige der hier beschriebenen Glykoside und ihre Aglykone geben mit NaOH in wässrigem Methanol charakteristische Färbungen, die zur Kontrolle dienen können und die in Tab. I zusammengestellt sind³). Bisher wurde aber noch keine Ausführungsform gefunden, die zur Anwendung auf Papier brauchbar wäre.

Proben von Inertosid und Leptosid wurden acetyliert und benzoiliert, doch konnten die zwei Acetate und die zwei Benzoate bisher nicht kristallisiert werden.

Herr Dr. *Chen* hatte die Freundlichkeit, die beiden neuen Glykoside biologisch zu prüfen⁴). Inertosid erwies sich dabei als völlig unwirksam. Zwei Katzen vertrugen die intravenöse Infusion von 10,323 bzw. 12,269 mg/kg. Ebenso ergab die Injektion von 24,87, 38,75 und 54,34 mg/kg an drei Fröschen keinen systolischen Herzstillstand. Leptosid hatte bei zwei Fröschen mit 6,65 und 13,7 mg/kg keine Wirkung, während ein dritter mit 25,9 mg/kg getötet wurde. An der Katze ergab sich für Leptosid in 10 Tieren als geometrisches Mittel der letalen Dosis $1,888 \pm 0,1606$ mg/kg. Es handelt sich demnach um ein Glykosid mit relativ schwacher digitalisartiger Wirkung.

Für diese Arbeit standen uns Mittel aus den Arbeitsbeschäftigungskrediten des Bundes zur Verfügung, wofür auch hier bestens gedankt sei.

Wir danken Herrn Dr. *A. Hunger* bestens für seine grosse Hilfe bei der Ausführung dieser Arbeit.

Nachtrag zur ersten Mitteilung über *Strophanthus intermedius Pax*⁵).

Bei der Photographie des Herbariumsmusters (S. 1825) ist der Masstab leider vergessen worden. Die Photographie ist linear ca. 2,36fach verkleinert. 0,425 cm der Photographie entsprechen genau 1 cm im Original.

¹) Vgl. spätere Mitteilung.

²) Einen graugrünen Fleck liefert auch Ouabain, sonst haben wir die grüne Farbe bisher nur beim Leptosid beobachtet.

³) Die sehr beständige weinrote Färbung beim Sarverogenin ist besonders charakteristisch. Die Farbreaktion lässt sich aber bisher nur gut im Glasröhrchen, nicht auf Papier ausführen. Sie wurde zuerst von *R. Richter* am Sarverogenin beobachtet, vgl. *Helv.* **36**, spätere Mitteilung.

⁴) Wir danken Herrn Dr. *K. K. Chen*, Indianapolis, auch hier bestens für die Überlassung seiner Resultate.

⁵) *J. v. Euv., H. Hess, P. Speiser & T. Reichstein, Helv.* **34**, 1821 (1951).

Tabelle I.
 Farbreaktionen mit NaOH in wässrigem Methanol¹⁾.

Zeit	Digitoxigenin	Cymarini	Ouabain	Intermediosid	Panstrosid	Sarverogenin	Leptosid	Leptogenin ²⁾	Substanz Nr. Heg 13
15"	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos
1'	farblos	farblos	farblos	blassrosa	blassrosa	blassgelb	blassrosa	gelb	blassrosa
3'	farblos	farblos	farblos	rosa	rosa, gelblich	blassrosa	orange	goldgelb	blassrosa
10'	farblos	farblos	farblos	orange	orange	rosa	tieforange	goldgelb	rosa
1 Std.	farblos	farblos	farblos	tieforange	orange	weinrot	tieforange	goldgelb	weinrot
2 Std.	farblos	farblos	farblos	tieforange	orange	weinrot	tieforange	goldgelb	weinrot
18 Std.	hellgelb	hellgelb	farblos	tieforange	orange	weinrot	braunorange	braunorange	weinrot
<i>Raymond-Reaktion</i> ³⁾	blauviolett	blauviolett	graugrün	blauviolett	blauviolett	blauviolett	blaugrün	graublau	blauviolett
Zeit	Inertosid	Inertogenin ²⁾	Sarmutiosid ²⁾	Musarosid ³⁾	Sarmutogenin ²⁾	Caudosid ²⁾	Caudogenin ²⁾	Glykosid Nr. 800	Glykosid Nr. 795
15"	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos
1'	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos
3'	blassrosa	blassgelb	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos
10'	gelb	orange	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos
1 Std.	honiggelb	orange	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	blassrosa
2 Std.	honiggelb	weinrot	hellgelb	hellgelb	hellgelb	farblos	farblos	farblos	blassrosa
18 Std.	orange	weinrot	hellgelb	hellgelb	hellgelb	hellgelb	hellgelb	farblos	blassrosa
<i>Raymond-Reaktion</i> ³⁾	blauviolett	blauviolett	blauviolett	blauviolett	blauviolett	blauviolett	blauviolett	blauviolett	blauviolett

¹⁾ Ausführung: 0,5 mg Substanz in Glühröhr mit 0,02 cm³ methanolischer Lauge mischen, verschlossen bei 20—22° stehenlassen. Bereitung der Lauge: 6 g NaOH in 25 cm³ Wasser lösen und mit 45 cm³ Methanol vermischen.

²⁾ Vgl. spätere Mitteilung.

³⁾ Mit 0,02 mg auf Papier (vgl. exp. Teil). Farbe 5' nach Spritzen mit Lauge, bleibt dann noch ca. 15' bestehen.

Experimenteller Teil.

Alle Smp. wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert, Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Drehung wurden 1 Std. bei 0,01 Torr und 70° getrocknet, zur Analyse 5 Std. bei 100° und 0,01 Torr über P_2O_5 , mit Einwaage im Schweinchen. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Zusatz von Wasser, Ausschütteln mit Chloroform-Äther (1:3), Waschen mit 2-n. HCl, 2-n. Sodalösung und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen, Ausführung der *Legal*-Reaktion¹⁾ und der *Keller-Kiliani*-Reaktion²⁾ nach früheren Angaben. Tüpfelprobe mit *Raymond*-Reagens auf Papier nach *Schindler & Reichstein*³⁾ mit dem Unterschied, dass mit m-Dinitrobenzol nicht gespritzt, sondern durch eine 5-proz. Lösung von m-Dinitrobenzol in Benzol gezogen, getrocknet und schliesslich mit NaOH in Methanol gespritzt wurde. Papierchromatographie nach *Schindler & Reichstein*³⁾ mit dem Unterschied, dass zum Tränken des Papiers mit Formamid dieses durch eine frisch bereitete Lösung von 25% entsäuertem Formamid³⁾ in Aceton gezogen, aufgehängt und 5 Min. an der Luft getrocknet wurde. Zum Entwickeln der Flecke wurde wie oben bei der *Raymond*-Reaktion angegeben, verfahren.

Ausführung der Verteilungschromatographie.

Da für die Verteilungschromatographie sehr grosse Mengen an Lösungsmitteln benützt werden, ist eine sorgfältige Reinigung aller Materialien wichtig.

Petroläther vom Sdp. 60–80° wurde 12 Std. mit konz. H_2SO_4 geschüttelt, mit Wasser und NaOH gewaschen, über $CaCl_2$ getrocknet und destilliert.

Benzol wurde mehrmals mit konz. H_2SO_4 bei 18° geschüttelt bis die Isatinprobe negativ war und die Säure sich höchstens noch leicht gelb färbte (zuletzt ca. 3 Std.). Dann wurde mit Wasser gewaschen, über $CaCl_2$ getrocknet und destilliert, wobei ein kleiner Vorlauf abgetrennt wurde.

Chloroform. Käufliches reines Chloroform mit 1% Alkoholgehalt wurde mit Soda gewaschen, mit etwas K_2CO_3 getrocknet und destilliert, wobei ein kleiner Vorlauf abgetrennt wurde.

Butanol. Käufliches, reines n-Butanol wurde bei 12 Torr destilliert. Es wurde das bei 65–72° übergehende Material verwendet.

Für die Chromatographie wurden alle Lösungsmittel durch Schütteln im Scheidetrichter mit Wasser gesättigt und zur scharfen Trennung 2 Std. stehengelassen, wobei für die eigentliche Chromatographie später herrschende Temperatur genau eingehalten werden muss.

Kieselgur. Käufliches Hyflo Super Cel⁴⁾ wurde in viel heissem dest. Wasser aufgeschlämmt und dann auf der Nutsche so lange mit dest. Wasser von 50° gewaschen, bis dieses auf Lakmus nicht mehr alkalisch reagierte. Dann wurde der Reihe nach mehrmals mit destilliertem Methanol, Benzol und Chloroform bei ca. 50° extrahiert, bis die Filtrate beim Eindampfen keinen wägbaren Rückstand mehr hinterliessen. Zum Schluss wurde mit Methanol gewaschen, scharf abgenutzt und 2 Tage unter gelegentlichem Umrühren bei 90–100° im Heizschrank getrocknet. Für die Chromatographie wurde 1 Teil dieses Pulvers mit 1 Teil Wasser vermischt, gut verrieben, gesiebt und mit ca. 3 Teilen des als erste mobile Phase dienenden Lösungsmittels (hier Benzol) 2–3 Std. energisch geschüttelt. Die so erhaltene Suspension diente zur Bereitung der Säule.

¹⁾ C. W. Shoppee & T. Reichstein, *Helv.* **27**, 434 (1944).

²⁾ J. v. Euv & T. Reichstein, *Helv.* **31**, 888 (1948).

³⁾ O. Schindler & T. Reichstein, *Helv.* **34**, 108 (1951).

⁴⁾ Produkt der Firma *Johns-Manville*, New York, bezogen von *Schneider & Cie.*, Winterthur.

Bereitung der Säule¹): Die Säule, die unten mit einer Glasfritte (oder Porzellanfilterplatte) und Hahn versehen war, wurde zu $\frac{1}{2}$ ihres Volumens mit dem Lösungsmittel gefüllt, das als erste mobile Phase diente (hier Benzol mit Wasser gesättigt). Dann wurde die oben erwähnte Suspension unter Rühren in kleinen Portionen eingefüllt. Dabei wurde durch leichtes Öffnen des Hahns das Lösungsmittel langsam ablaufengelassen und das feste Pulver mit einer in einem Stab (rostfreier Stahl) befestigten Siebplatte (ebenfalls rostfreier Stahl) ständig gut und gleichmässig gepresst. Dabei muss die Masse immer von Lösungsmittel bedeckt bleiben und alle Luftblasen sollen entweichen. Nachdem die erforderliche Menge aufgetragen war, wurde mit Benzol nachgewaschen und schliesslich bis fast an das obere Niveau der Kieselgurschicht ablaufen gelassen.

Chromatographie: Sie erfolgt zweckmässig in einem Raum mit konstanter Temperatur. Die Substanz wird in wenig Aceton oder Chloroform²) gelöst, mit der 5- bis 10fachen Menge feuchtem Kieselgur gut vermischt, im Vakuum bei 20° vom organischen Lösungsmittel befreit, mit 2 Teilen (auf feuchtes Kieselgur berechnet) der zum Anfang benützten mobilen Phase (hier Benzol) gut durchgeschüttelt, auf die Säule gebracht und gut aufgepresst. Dann wird nach der Durchlaufmethode chromatographiert, wobei für schwer trennbare Gemische die in Tab. II angegebenen Durchlaufgeschwindigkeiten nicht überschritten werden sollen³). Bei kleinen Substanzmengen ist ein automatischer Fraktionensammler sehr vorteilhaft, bei grösseren Mengen genügt es im allgemeinen, die Fraktionen alle 12 Std. abzunehmen.

Dimensionen der Säule im Vergleich zur Substanzmenge: Für schwer trennbare Gemische haben sich die folgenden Dimensionen am besten bewährt⁴).

Tabelle II.

Nr.	Lichte Weite	Nutzbare Rohrlänge	Länge der Kieselgurschicht	Kieselgur-Wasser (1:1)	Maximale Substanzmenge ⁴)	Maximale Durchlaufgeschwindigkeit pro Std. ⁵)
1	26 mm	61 cm	ca. 50 cm	200 g	0,4 g	4 cm ³
2	45 mm	90 cm	ca. 65 cm	700 g	1,4 g	18 cm ³
3	55 mm	120 cm	ca. 90 cm	1,5 kg	3 g	35 cm ³
4	65 mm	140 cm	ca. 115 cm	3 kg	6 g	70 cm ³

Die Säule muss selbstverständlich immer mit organ. Lösungsmittel bedeckt bleiben, eine automatische Nachfüllvorrichtung mit genügend grossem Vorratsgefäss ist daher zweckmässig. Nach beendigter Chromatographie kann dieselbe Säule für gleiche Zwecke meistens wieder verwendet werden. Das letzte Lösungsmittel muss dafür nur gut durch dasjenige verdrängt werden, das zum Anfang benützt werden soll.

Trennung von Cymarol und Cymarin. Für die Trennung dienten 88 mg krist. Cymarin aus *Strophanthus Nicholsonii* vom Smp. 136–139°, das bereits durch Chromatographie an Al_2O_3 gereinigt worden war, aber nach Papierchromatographie (vgl.

¹) Soll möglichst bei derselben Temperatur wie die anschliessende Chromatographie durchgeführt werden.

²) Methanol scheint für diesen Zweck etwas weniger günstig, da es vom Kieselgur relativ stark adsorbiert wird und im Vakuum schwerer zu entfernen ist.

³) Für leicht trennbare Gemische kann oft bedeutend rascher chromatographiert werden.

⁴) Bei leicht trennbaren Gemischen (meistens auch bei Mutterlaugen oder Rohextrakten) kann etwas mehr Substanz aufgetragen werden.

⁵) Bei leicht trennbaren Gemischen kann die Durchlaufgeschwindigkeit teilweise erheblich gesteigert werden.

Fig. 1.1) noch etwas Cymarol enthielt. Verwendet wurden 80 g Kieselgur-Wasser (1:1), Säule Nr. 1 und als mobile Phase ausschliesslich feuchtes Benzol. Durchlaufgeschwindigkeit 1,25 cm³ pro Std. Es wurden Fraktionen von je 5 cm³ (alle 4 Std.) genommen. Temperatur: 18°.

Die ersten 75 cm³ hinterliessen keinen wägbaren Rückstand, dann erschien die erste Fraktion, die bereits positive *Raymond*-Reaktion zeigte. Die Fraktionen 2—9 lieferten 69 mg Rohprodukt und aus Methanol-Äther 64 mg reines Cymarol, Smp. 141—142°, nach Papierchromatogramm (vgl. Fig. 1. 3) einheitlich.

Die Fraktionen 10—14 gaben 8 mg Rohprodukt, aus Methanol-Äther 6 mg Kristallgemisch, Smp. 136—138°. Im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 1. 4) wurde ein starker Fleck erhalten, der Cymarol entsprach, sowie zwei schwache, von denen einer mit Cymarol übereinstimmte.

Die Fraktionen 15—17 gaben 12 mg Eindampfrückstand, aus Methanol-Äther 8 mg Cymarol in Prismen, Smp. 232—240°. Nach Mischprobe und Farbreaktion mit authentischem Material identisch. Nach Papierchromatographie (vgl. Fig. 1. 5) einheitlich.

Trennung von Kristallinat Nr. 790 aus *Strophanthus intermedius Pax*.

Für diese Trennung dienten 1,5 g Material, wofür die zwei folgenden Präparate vereinigt wurden, die in der ersten Mitteilung¹⁾ auf S. 1829 beschrieben sind²⁾.

400 mg „Kristallinat Nr. 790“ aus den Fraktionen 8—13 der Chromatographie der Rohkristalle aus Chloroformextrakt.

„1,19 g rohes Kristallinat Nr. 790 vom Smp. 130—136°“ aus den Fraktionen 6—14 der Chromatographie der Mutterlaugen des Chloroformextrakts. (Zeilen 5 und 6 von unten auf S. 1829.) Davon wurden 1,09 g verwendet.

Diese zwei Präparate wurden gemischt. Das Material zeigte Smp. 130—138°. Im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 2. 1) gab es 3 starke und einen schwachen Fleck. Die 4 Flecke zeigten Laufstrecken wie Intermediosid, Inertosid, Leptosid und Panstrosid, der dem letztgenannten Stoff entsprechende Fleck war schwach.

Für die Trennung der 1,5 g Kristallinat Nr. 790 wurde Säule Nr. 3 und 1,5 kg Kieselgur-Wasser (1:1) verwendet. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 32 cm³ pro Std. Die Fraktionen wurden jede 12 Std. (entspr. 384 cm³) gewechselt und im Vakuum bei 40° eingedampft. Es wurde mit Benzol begonnen und allmählich auf Chloroform übergegangen.

Die Fraktionen 1—3, eluiert mit Benzol, gaben nur 7 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 4—9 (396 mg, eluiert mit Benzol) gaben aus Aceton-Äther 331 mg reines Intermediosid, Smp. 199—202° und noch 9 mg vom Smp. 198—200°.

Die Fraktionen 10—13 (400 mg, eluiert mit Benzol) gaben aus Aceton-Äther 350 mg rohes Inertosid in grossen durchsichtigen Prismen. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol-Äther und Aceton-Äther wurden daraus 314 mg reines Inertosid, Smp. 159—161°, erhalten.

Die Fraktionen 14—19 (210 mg, eluiert mit Benzol) gaben aus Aceton-Äther Kristallgemische von viel Nadeln, die mit wenig Körnern durchsetzt waren. Da eine Trennung durch fraktionierte Kristallisation nicht gelang, wurde mit der Pinzette unter der Lupe mechanisch getrennt. Die Nadeln gaben nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther, Methanol-Äther, Methanol-Wasser und Methanol-Äther 150 mg Inertosid, das nach Papierchromatogramm noch Spuren Leptosid enthielt. Die Mutterlaugen gaben noch 32 mg Inertosid vom Smp. 157—160°. Die Körner gaben aus Aceton-Äther 38 mg Leptosid, Smp. 198—200°.

¹⁾ *J. v. Euw, H. Hess, P. Speiser & T. Reichstein, Helv. 34, 1822 (1951).*

²⁾ Das Material stammte somit aus Samenprobe b) aus der Gegend von Pungo-Andongo und Sengue (Angola) von Pflanzen, die nach genauer Kontrolle völlig dem typischen *S. intermedius Pax* entsprachen.

Die Fraktionen 20—28 (238 mg, eluiert mit Benzol) gaben aus Aceton-Äther 62 mg Leptosid, Smp. 197—200°. Sie wurden mit den 38 mg aus den Fraktionen 14—19 vereinigt und zusammen aus Methanol-Wasser, dann aus Aceton-Äther umkristallisiert. Es resultierten 97 mg reines Leptosid, Smp. 196—199°.

Die Fraktionen 29—35 (60 mg, eluiert mit Benzol) gaben aus Methanol-Wasser nur 10 mg Kristallgemisch, Smp. 170—190°.

Die Fraktionen 36—40¹⁾ (66 mg, eluiert mit Benzol-Chloroform (3:2), Benzol-Chloroform (2:3) und reinem Chloroform) gaben aus Aceton-Äther 26 mg Panstrosid in feinen Körnern, Smp. 212—216°.

Die Fraktionen 41—42, eluiert mit Chloroform, gaben nur noch 20 mg braunes amorphes Material, das nur eine sehr schwache *Raymond*-Reaktion gab.

Aus den 1,5 g Kristallinat Nr. 790 wurden somit erhalten: 340 mg Intermediosid, 516 mg Inertosid (davon 182 mg, die noch Spuren Leptosid enthielten), 111 mg Leptosid und 26 mg Panstrosid. Diese vier Stoffe entsprachen genau den im Papierchromatogramm beobachteten 4 Flecken.

Trennung der amorphen Mutterlaugen von Kristallinat Nr. 790.

Hierzu dienten 2,0 g Material, die durch Vereinigung der folgenden zwei Präparate erhalten wurden. (Vgl. wieder S. 1829 der 1. Mitteilung.)

„215 mg amorphe Mutterlaugen“ aus Fraktionen 8—13 der Chromatographie der Rohkristalle aus Chloroformextrakt.

„3,24 g amorphe Mutterlauge“ aus Fraktionen 6—14 der Chromatographie der Kristallmutterlaugen aus Chloroformextrakt (5. Zeile von unten, S. 1829).

Beide Präparate wurden gemischt und von diesem Gemisch 2 g verwendet. Dieses Material zeigte im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 2. 8) vier Flecke, die den folgenden vier Stoffen zugeordnet werden konnten: Intermediosid, Inertosid, Sarverogenin und Leptosid.

Die genannten 2 g wurden genau wie oben an 1,5 kg Kieselgur-Wasser (1:1) chromatographiert. Es wurden alle 12 Std. Fraktionen von 350 cm³ abgetrennt.

Die Fraktionen 1—3, eluiert mit Benzol, gaben 120 mg Öl.

Die Fraktionen 4—8 (783 mg, eluiert mit Benzol) gaben aus Aceton-Äther 670 mg reines Intermediosid, Smp. 199—201°.

Fraktion 9 (51 mg, eluiert mit Benzol) gab aus Aceton-Äther zuerst 7 mg Intermediosid, Smp. 196—200°, dann 10 mg Kristallgemisch, Smp. 124—126°.

Die Fraktionen 10—13 (237 mg, eluiert mit Benzol) gaben aus Methanol-Äther Nadeln, Smp. 136—141°. Nach Impfen mit der hochschmelzenden Form von Sarverogenin wurden 161 mg reines Sarverogenin, Smp. 228—229°, erhalten. Die Mutterlauge gab aus Methanol-Äther nach längerem Stehen 11 mg rohe Substanz Nr. Heg 13²⁾ in Nadeln, Doppel-Smp. 134—135°/225—231°.

Die Fraktionen 14—17 (238 mg, eluiert mit Benzol) gaben aus Methanol-Äther, dann aus Aceton-Äther 150 mg Inertosid, Smp. 159—161°.

Fraktion 18 (32 mg, eluiert mit Benzol) gab aus Methanol-Äther 5 mg Kristallgemisch, Smp. 146—152°.

¹⁾ Von Fraktion 36 an wurde die Durchlaufgeschwindigkeit auf 1 Liter pro 12 Std. gesteigert und somit 1-1-Fraktionen entnommen.

²⁾ Substanz Nr. Heg 13 wurde in kleiner Menge auch aus dem „Ätherextrakt“ der Glykoside aus Samen von *Strophanthus amboensis* (*Schinz*) *Engl. et Pax* aus Südwest-Afrika erhalten. Vgl. spätere Mitteilung. Er zeigte die folgenden Reaktionen: *Keller-Kiliani*-Reaktion: negativ, Zuckerprobe: positiv, Tetrannitromethanprobe: negativ, Färbung mit 84-proz. H₂SO₄: farblos (im ersten Moment), fleischrosa (1'), rosa mit grünem Rand (5'), grasgrün (15—60'), graugrün (75'). Farbreaktion mit NaOH vgl. Tab. I, theoret. Teil.

Die Fraktionen 19—24 (336 mg, eluiert mit Benzol) gaben aus Aceton-Äther 221 mg reines Leptosid, Smp. 199—202° und 5 mg weniger reine Kristalle, Smp. 194—200°.

Die Fraktionen 25 und 26 (eluiert mit Benzol) und Fraktion 27 (eluiert mit Benzol-Chloroform (9:1)) gaben insgesamt 20 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 28—31 (eluiert mit Benzol-Chloroform (1:1) und (3:1)) gaben insgesamt 160 mg amorphes Material, das nur sehr schwache *Raymond*-Reaktion gab.

Insgesamt wurden aus den 2 g Material somit erhalten: 677 mg Intermediosid, 161 mg Sarverogenin, 150 mg Inertosid, 221 mg Leptosid und 11 mg Substanz Nr. Heg 13.

Beschreibung der isolierten Substanzen.

Intermediosid: Aus Methanol-Äther oder Aceton-Äther farblose feine Nadeln, Smp. 199—201°; $[\alpha]_D^{19} = +22,00 \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,185$ in Methanol). Authentisches Intermediosid und die Mischprobe schmolzen gleich. Zur Kontrolle wurde eine Probe (200 mg) hydrolysiert¹⁾. Das rohe Genin (146 mg) gab aus Methanol Sarverogenin, Smp. 228—229°, Mischprobe ebenso. Der rohe Zucker (40 mg) gab nach Destillation im Molekularkolben aus abs. Äther 32 mg krist. D-Diginose, Smp. 89—91° (nach 1-tägigem Stehen über CaCl₂ ohne Vakuum), Mischprobe ebenso.

Sarverogenin. Aus Methanol zuerst Nadeln, Smp. 134—140°. Aus feuchtem Methanol nach Impfen mit hochschmelzender Form Nadeln, Smp. 227—230°. Authentisches Sarverogenin und die Mischprobe schmolzen gleich, auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ waren gleich: rosa (0'), lila (7'), lila mit blauem Rand (10'), blau (20'), tiefblau (1 Std.), grasgrün (3 Std.).

Panstrosid. Aus Aceton-Äther feine Körner, Smp. 212—216°, aus feuchtem Aceton-Äther nach Impfen mit hochschmelzender Form kleine Nadeln, Smp. 230—236°; $[\alpha]_D^{18} = +30,00 \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,164$ in Methanol).

Authentisches Panstrosid und die Mischprobe schmolzen gleich, auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ waren gleich.

Inertosid. Aus Methanol-Wasser oder Aceton-Äther Nadelbüschel, Smp. 159—161°. Aus Methanol-Äther Nadeln, Smp. 155—168°, manchmal mit Doppel-Smp. 155—168°/227—244°; $[\alpha]_D^{20} = -45,80 \pm 3^{\circ}$ ($c = 0,786$ in Methanol).

7,81 mg Subst. zu 0,9935 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{20} = -0,360 \pm 0,02^{\circ}$

4,107 mg Subst. gaben 0,121 mg Gewichtsverlust = 2,94%

C₃₀H₄₄O₁₀, H₂O (582,67) Ber. H₂O 3,10%

3,986 mg Subst. gaben 9,305 mg CO₂ und 2,740 mg H₂O (OAB)

3,268 mg Subst. verbr. 1,752 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃ (*Zeisel-Vieböck*) (OAB)

C₃₀H₄₄O₁₀ (564,65) Ber. C 63,81 H 7,85 —OCH₃ 5,49%

Gef. „ 63,71 „ 7,69 „ 5,55%

Legal-Reaktion: positiv (orangerot), *Keller-Kiliani*-Reaktion: positiv (graublau), Tetrantromethanprobe: negativ, Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄: schmutzig gelbbraun (1'), oliv-gelbbraun (15'), sepiabraun (2 Std.), kastanienbraun (15 Std.), grauviolett (23 Std.). UV.-Spektrum und biolog. Prüfung siehe theoret. Teil.

Acetylierungsversuch. 70 mg Inertosid mit 1 cm³ Pyridin und 0,7 cm³ Acetanhydrid 36 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung (mit Chloroform-Äther (1:3)) gab 81 mg Rohprodukt, das auch nach Chromatographie an Al₂O₃ nicht kristallisierte.

Benzoylierungsversuch. 100 mg Inertosid in 3 cm³ abs. Pyridin bei 0° mit 0,6 cm³ reinstem Benzoylchlorid versetzt, 1 Std. bei 0° und 25 Std. bei 20° stehengelassen. Nach Zusatz von 0,4 cm³ Methanol wurde noch 2 Std. stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung und Trocknen bei 0,01 Torr und 80° gab 127 mg Rohprodukt als farblosen Schaum, das auch nach Chromatographie an Al₂O₃ nicht kristallisierte.

¹⁾ J. P. Rosselet & A. Hunger, *Helv.* **34**, 1036 (1951).

Leptosid. Aus Methanol-Wasser Körner, Smp. 194–195°, aus Aceton-Äther oder Methanol-Äther kleine Würfel, Smp. 199–202°; $[\alpha]_D^{17} = +22,0^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,0045$ in Methanol).

9,98 mg Subst. zu 0,99353 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{17} = +0,22^\circ \pm 0,02^\circ$
 3,927 mg Subst. gaben 9,230 mg CO₂ und 2,700 mg H₂O (OAB)
 4,356 mg Subst. gaben 10,200 mg CO₂ und 3,040 mg H₂O (A. P.)
 5,758 mg Subst. verbr. 3,606 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃ (Zeisel-Vieböck) (OAB)
 C₃₀H₄₄O₁₀ (564,65) Ber. C 63,81 H 7,85 —OCH₃ 5,49%
 Gef. „ 64,14; 63,96 „ 7,69; 7,81 „ 6,48%

Legal-Reaktion: positiv (orangerot), Keller-Kiliani-Reaktion: positiv (blau), Tetranitromethanprobe: negativ (farblos), Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄: gelb (0'), graugelb (10'), oliv-gelbbraun (15'), grauviolett (2–24 Std.). UV.-Spektrum und biolog. Prüfung siehe theoret. Teil. Raymond-Reaktion: blaugrün.

Acetylierungsversuch. 60 mg Leptosid wie oben acetyliert gaben 74 mg Rohprodukt, das auch nach Chromatographie nicht kristallisierte.

Benzoyleierungsversuch. 100 mg Leptosid, wie bei Inertosid beschrieben benzoyleiert, gaben 168 mg rohes Benzoat. Dieses lieferte nach Chromatographie an Al₂O₃ 136 mg farblosen Schaum, der bisher nicht kristallisierte.

Die Mikroanalysen wurden teils im Mikrolabor der Organisch-chemischen Anstalt, Basel (Leitung F. Thommen) (OAB), teils bei Herrn A. Peisker, Brugg (A. P.) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Eine Variante zur bekannten Trennung herzaktiver Glykoside durch Verteilungschromatographie wird beschrieben. Als stationäre Phase diente Wasser mit gereinigtem Kieselgur als Träger. Das aus den Samen von *Strophanthus intermedius Pax* früher erhaltene Kristallinat Nr. 790, das ein schwer trennbares Gemisch darstellt, liess sich mit dieser Methode in vier nach Papierchromatogramm und sonstigem Verhalten einheitliche Stoffe aufteilen, die den vier papierchromatographisch nachweisbaren Komponenten des zur Trennung verwendeten Präparats von Kristallinat Nr. 790 entsprachen. — Von diesen vier Stoffen waren zwei mit Intermediosid und Panstrosid identisch. Die zwei andern stellen neue Glykoside dar. Sie werden als Inertosid und Leptosid bezeichnet. Nach den bisherigen Analysen kommt beiden die Formel C₃₀H₄₄O₁₀ zu, sie sind demnach isomer mit Intermediosid und zeigen ein ähnliches UV.-Absorptionsspektrum wie dieses. Inertosid zeigte keine nachweisbare digitalisartige Wirkung, Leptosid war sehr schwach wirksam. Inertosid und Leptosid liessen sich in gleicher Weise auch aus den Mutterlaugen von Kristallinat Nr. 790 erhalten. Sie sind in den Samen reichlich enthalten und dürften nach Intermediosid und Panstrosid zu den Hauptglykosiden derselben gerechnet werden.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.