

## 221. Die Glykoside der Samen von *Strophanthus Eminii Asch et Pax.*

3. Mitteilung<sup>1)</sup>.

Glykoside und Aglykone, 184. Mitteilung<sup>2)</sup>

von R. Zelnik und O. Schindler.

(25. IX. 57.)

Die Glykoside der Samen von *Strophanthus Eminii Asch et Pax* sind schon wiederholt untersucht worden<sup>3)</sup>. In der letzten Untersuchung erhielt *Lardon* nach Fermentierung als Hauptglykoside Periplocyamarin, Cymarine, Cymarol und Emicymarin. Daneben isolierte er noch kleine Mengen von Allo-emicymarin, Periplogenin und Strophanthidol, sowie 3 nicht aufgeklärte Nebenprodukte A, B und C. Von diesen war A vermutlich ein acetyliertes Aglykon ( $C_{25}H_{36}O_6$ ), B ein Diglykosid  $C_{36}H_{54}O_{14}$  mit Methoxyl und Aldehydgruppe, das ein krist. Acetylderivat lieferte und C ein Monoglykosid  $C_{30}H_{46}O_9$  (?) mit Methoxyl, das eine positive *Keller-Kiliani*-Reaktion gab und ebenfalls ein krist. Acetylderivat lieferte.

Wir haben die Bearbeitung dieser Droge noch einmal aufgenommen, um durch papierchromatographische Kontrolle der Isolierungsstufen auch solche digitaloide Stoffe erfassen zu können, die nur in geringer Konzentration in den Extrakten enthalten sind, oder deshalb bisher nicht aufgefunden werden konnten, weil sie nicht kristallisierten.

Als Ausgangsmaterial dienten Samen, die uns von der *Twentsche Overzee Handel Maatschappij* in Form ganzer Früchte aus Dar-es-Salaam (Tanganjika) im Jahre 1951 zugesandt wurden<sup>4)</sup>. Die Droge war somit im Zeitpunkt der Aufarbeitung mindestens 6 Jahre alt.

Für die Isolierung der herzwirksamen Glykoside haben wir uns genau an die schon früher<sup>1)5)</sup> beschriebene Methode gehalten, indem wir die sameneigenen Fermente zur Wirkung kommen liessen und hierauf in Äther-, Chloroform- und Chloroform-Alkohol-(2:1)-lösliche Extrakte zerlegten.

<sup>1)</sup> 1. Mitteilung: *P. Speiser & T. Reichstein*, Helv. **30**, 2143 (1947); 2. Mitteilung: *A. Lardon*, Helv. **33**, 639 (1950).

<sup>2)</sup> 183. Mitteilung: *J. v. Euw, J. Gürtler, A. Lardon, K. Mohr, F. Reber, R. Richter, O. Schindler & T. Reichstein*, Helv. **40**, 2079 (1957).

<sup>3)</sup> Literatur über die früheren Arbeiten siehe bei *A. Lardon*<sup>1)</sup>.

<sup>4)</sup> Wir danken der *N. V. Organon*, Oss, auch an dieser Stelle bestens für die Vermittlung der Droge.

<sup>5)</sup> *J. v. Euw, H. Hess, P. Speiser & T. Reichstein*, Helv. **34**, 1821 (1951).

Der Ätherextrakt zeigte im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 1) sechs Flecken, bezeichnet als A, B, C, E, F und G, von denen F und G erst nach Anreicherung durch Chromatographie sichtbar wurden. Durch Kristallisation konnte ein Gemisch (entspr. Flecken A und C) abgetrennt werden. Die Auftrennung der Mutterlauge, die im Papierchromatogramm (vgl. 2 in Fig. 1) Flecken A, B, C und E und ausserdem eine in dem verwendeten System nicht wandernde Substanz zeigte, wurde durch (teilweise wiederholte) Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  versucht. Dabei gelang es, die zwei den Flecken A und B entsprechenden Substanzen in papierchromatographisch reiner Form in Kristallen zu erhalten. Sie liessen sich mit Periplocymarin<sup>6)</sup> und Alloperiplocymarin<sup>7)</sup> identifizieren. Da die kürzer laufenden Flecken C, E, F und G im Chloroformextrakt angereichert waren, haben wir die Auftrennung der betr. Fraktionen nicht weiter verfolgt.

Der Chloroformextrakt enthielt neben den schon erwähnten Flecken C, E, F und G fünf weitere mit *Kedde*-Reagens positiv reagierende Substanzen, die als D, H, I, J und K bezeichnet wurden (vgl. 12, 13 in Fig. 2). Von diesen konnte durch Kristallisation das Gemisch der Substanzen C, E, F und G abgetrennt werden. Durch Chromatographie des letzteren an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  liess sich dann die Substanz C rein erhalten und mit Cymarin<sup>8)</sup> identifizieren. Auf dem gleichen Wege konnten auch die Flecken E mit Cymarol<sup>9)</sup> und F mit Emicymarin<sup>10)</sup> identifiziert werden. Die analoge Chromatographie der Mutterlaugen lieferte nur Emicymarin in einheitlicher kristallisierter Form. Ebenso wenig gelang es durch Verteilungschromatographie im System Propylenglykol-Wasser-(1:4) als stationäre und Chloroform als mobile Phase eine Auftrennung der stärker polaren Glykoside F, G, H, I, J und K zu erreichen.

Nachdem es sich bei der papierchromatographischen Kontrolle des Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extraktes gezeigt hatte, dass diese Substanzen besonders reichlich darin enthalten waren, wurde versucht, sie daraus in reinem Zustande zu erhalten. Dies wurde dadurch begünstigt, dass sich beim erneuten Auftrennen dieses Extraktes zwischen Wasser und Chloroform, Chloroform-Alkohol-(9:1)- und -(2:1)-Gemischen die gesuchten Substanzen vor allem in den beiden ersteren Extrakten angereichert hatten (vgl. 21, 22, 23 in Fig. 2). Die Verteilungschromatographie dieses Materials wurde mit Wasser als stationärer Phase und Benzol-n-Butanol-Gemischen verschiedener Zusammensetzung als mobiler Phase durchgeführt. Von den im Gemisch

<sup>6)</sup> W. A. Jacobs & A. Hoffmann, J. biol. Chemistry **79**, 519 (1928); A. Stoll & J. Renz, Helv. **22**, 1193 (1939).

<sup>7)</sup> A. Katz & T. Reichstein, Helv. **28**, 476 (1945).

<sup>8)</sup> W. A. Jacobs & A. Hoffmann, J. biol. Chemistry **67**, 609 (1926).

<sup>9)</sup> W. Blome, A. Katz & T. Reichstein, Pharm. Acta Helv. **21**, 325 (1946).

<sup>10)</sup> I. D. Lamb & S. Smith, J. chem. Soc. **1936**, 442.

enthaltenen Substanzen F, G, H, I, J, K und L konnte nur K rein erhalten werden. Dieses liess sich durch Kristallisation aus Fraktionen, in denen es von wenig J begleitet war, abtrennen. Die Substanz K erwies sich als identisch mit Ledienosid<sup>11)</sup>. Um auch die übrigen Substanzen in reiner Form erhalten zu können, wurden die Fraktionen der Verteilungschromatographie gruppenweise durch präparative Papierchromatographie<sup>12)</sup> aufgetrennt und auf diese Weise die Substanzen J und L neben weitem Mengen von Ledienosid (K) in papierchromatographisch reiner Form erhalten. Die dem Flecken I entsprechende Substanz erwies sich aber, als sie in genügend angereicherter Form vorlag, noch als Gemisch zweier im Papierchromatogramm nahe beieinander liegender Substanzen, deren Auftrennung nicht weiter verfolgt wurde.

Die den Flecken D und G entsprechenden Substanzen konnten nicht als einheitliche Stoffe erhalten werden. Beim direkten Vergleich in Papierchromatogrammen zeigte D die gleiche Laufstrecke wie Allocymarin und G wie Allo-emicymarin. Über den ungefähren Gehalt an den einzelnen Glykosiden in den Samen orientiert Tab. 1.

Tabelle 1.

Substanz	Flecken im Papier- chromatogramm	Erhaltene Menge in reiner Form aus 1 kg Samen mg	Geschätzter Gehalt in %
Periplocymarin . . . . .	A	106	0,16
Allo-periplocymarin . . . . .	B	91	0,02
Cymarin . . . . .	C	537	0,49
Allo-cymarin . . . . .	D		0,13
Cymarol . . . . .	E	101	0,19
Emicymarin . . . . .	F	1917	0,54
Allo-emicymarin . . . . .	G		0,31
Substanz H . . . . .	H	50 (amorph)	0,005
Substanzen I + I' . . . . .	I	15 (amorph)	0,0015
Substanz J . . . . .	J	29,5 (amorph)	0,0029
Ledienosid . . . . .	K	85	0,0085
Substanz L . . . . .	L	3	0,0008

Diskussion: Die untersuchten Samen waren recht alt, was den relativ hohen Gehalt an Allo-(= 17  $\alpha$ -)-Glykosiden erklären dürfte; dadurch wurde auch die Trennung wesentlich erschwert. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten wurden dieselben vier Hauptglykoside gefunden. Als neue Stoffe wurden isoliert: Ledienosid, sowie die nicht aufgeklärten Stoffe, denen die Flecken H, I, I' und L entsprachen. Möglicherweise ist Subst. L identisch mit Allo-ledienosid.

<sup>11)</sup> H. Lichti, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. **39**, 1914 (1956).

<sup>12)</sup> Ausführungsform von E. von Arx & R. Neher, Helv. **39**, 1664 (1956).

Die Identifizierung von Periplocymarin, Allo-periplocymarin, Cymarin, Cymarol, Emicymarin und Ledienosid erfolgte durch Vergleich der Schmelzpunkte, Mischschmelzpunkte, spez. Drehung, Farbreaktionen mit 84-proz.- und konz.  $H_2SO_4$ , sowie Papierchromatogramme. Emicymarin wurde zusätzlich als Di-O-acetyl-emicymarin und durch Analyse identifiziert.

Das isolierte *Ledienosid* wurde dazu benützt, um die Konstitution dieses erstmals aus *Stroph. Ledienii*<sup>13)</sup> erhaltenen Glykosides definitiv zu beweisen. Auf Grund der Laufstrecken im Papierchromatogramm der bei der sauren Hydrolyse nach *Mannich*<sup>13)</sup> erhaltenen Bruchstücke wurde früher für Ledienosid die Konstitution I angegeben. Die Durchführung der Hydrolyse im präparativen Maßstab hat dies bestätigt. Aus den wasserlöslichen Teilen der Hydrolyse nach *Mannich*<sup>13)</sup> wurde der Zucker in kristallisierter Form erhalten, der nach Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und Papierchromatogramm (vgl. Fig. 3) mit D-Fucose identisch war. Der Rückstand der Mutterlaugen wurde ins p-Bromphenylhydrazon übergeführt und dabei krist. D-Fucose-p-bromphenylhydrazon erhalten. Die positive Drehung dieses Derivates ist beweisend dafür, dass der Zucker zur D-Reihe gehört.

Die chloroformlöslichen Anteile der Hydrolyse wurden an  $Al_2O_3$  chromatographisch aufgetrennt, dabei wurde Periplogenin kristallisiert erhalten. Daneben wurde ein kristallisierter Stoff isoliert, der die Eigenschaften eines der 3 möglichen Anhydroperiplogene<sup>10)14)15)</sup> zeigte. Da der Stoff im UV. nur die Absorption des Butenolid-Ringes zeigte, kann es sich dabei nicht um 3,5-Dianhydroperiplogenin handeln. Im Papierchromatogramm (vgl. 34 in Fig. 3) war der Stoff identisch mit einem früher von *Katz*<sup>15)</sup> bei der Hydrolyse von Emicymarin erhaltenen Anhydrogenin.

Durch saure Hydrolyse der krist. Subst. L liess sich wahrscheinlich machen, dass es sich bei dieser Substanz um Allo-ledienosid handelt. Die wasserlöslichen Anteile aus der sauren Hydrolyse dieser Substanz gaben im Papierchromatogramm (vgl. 44 in Fig. 3) nur einen reduzierenden Flecken mit der gleichen Laufstrecke wie D- oder die gleich laufende L-Fucose, die sich in den verwendeten Systemen gut von L-Rhamnose, D-Gulomethylose und D-Digitalose unterscheiden liessen. Die in Chloroform löslichen Teile waren im Papierchromatogramm identisch mit Allo-periplogenin (vgl. 37 in Fig. 3)<sup>6)</sup>.

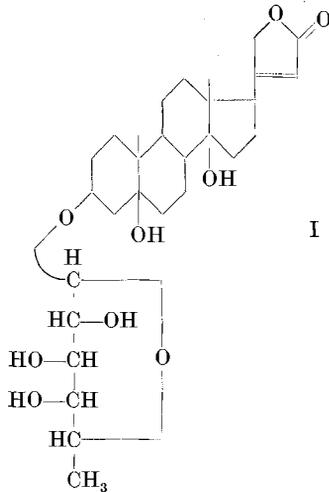
*Substanz H*, die weder als freies Glykosid noch in acetylierter Form bisher kristallisiert erhalten werden konnte, zeigte im UV. (vgl. Fig. 4) neben der Absorption des Butenolid-Ringes kein weiteres Absorptionsmaximum, so dass diese Substanz sehr wahrscheinlich kein Derivat des Strophanthidins darstellt. Subst. H wurde weder durch

<sup>13)</sup> C. Mannich & G. Siewert, Ber. deutsch. chem. Ges. **75**, 737 (1942).

<sup>14)</sup> W. A. Jacobs & N. M. Bigelow, J. biol. Chemistry **101**, 697 (1933).

<sup>15)</sup> A. Katz & T. Reichstein, Pharmac. Acta Helv. **19**, 231 (1944).

Strophanthobiase<sup>15a</sup>), noch durch Schneckenferment<sup>16</sup>) verändert, wie aus dem Verhalten im Papierchromatogramm (vgl. 26 in Fig. 2) geschlossen werden konnte. Es dürfte sich demnach sehr wahrscheinlich um ein Monoglykosid handeln. Da Substanz H sowohl bei der *Keller-Kiliani*-Reaktion als auch bei der Xanthhydroprobe nach *Pesez*<sup>18</sup>) positiv anzeigte, wurde versucht, durch milde saure Hydrolyse Einblick in die Konstitution dieses Glykosides zu erhalten. Überraschend zeigte sich dabei aber, dass die Bedingungen, die zur Hydrolyse des Glykosides eines 2-Desoxyzuckers sonst genügten<sup>19</sup>), hier nicht zur nachweisbaren Abspaltung eines Zuckers führte, sondern dass das Glykosid im wesentlichen unverändert blieb.



I (Ledienosid)  
F. 168<sup>0</sup> + 4,7 Me<sup>11</sup>)<sup>22</sup>)

Auch das Gemisch der *Substanzen I und I'* wurde weder durch Strophanthobiase<sup>6</sup>) noch durch Schneckenferment<sup>16</sup>) verändert (vgl. 27 in Fig. 2), so dass es sich auch hier sehr wahrscheinlich um Monoside handeln dürfte.

*Substanz J.* 0,7 mg dieser amorphen, papierchromatographisch einheitlichen Substanz (UV.-Spektrum vgl. Fig. 4) wurden einer Hydrolyse nach *Mannich*<sup>13</sup>) unterworfen und sowohl der dabei entstehende wasserlösliche, als auch der chloroformlösliche Teil im Papierchromatogramm untersucht. Der wasserlösliche Zuckerteil zeigte dabei eine Laufstrecke, die derjenigen von D-Digitalose entsprach (vgl. 41 in Fig. 3). Der chloroformlösliche Aglykonteil zeigte eine Laufstrecke,

<sup>15a</sup>) A. Stoll & J. Renz, *Enzymologia* **7**, 362 (1939).

<sup>16</sup>) H. Huber, F. Blindenbacher, K. Mohr, P. Speiser & T. Reichstein, *Helv.* **34**, 46 (1951).

<sup>17</sup>) In der Ausführungsform von J. v. Euw & T. Reichstein, *Helv.* **31**, 883 (1948).

<sup>18</sup>) M. Pesez, *Ann. pharmac. Franc.* **10**, 104 (1952).

<sup>19</sup>) S. Rangaswami & T. Reichstein, *Helv.* **32**, 939 (1949).

die etwas grösser war als diejenige des parallel gelaufenen Digitoxigenins (vgl. 39 in Fig. 3). Da Subst. J sicher verschieden war von Digitoxigenin- $\beta$ -D-digitalosid (Odosid H)<sup>20</sup>, dürfte der im Papierchromatogramm nachgewiesene Flecken einem während der Hydrolyse entstandenen Anhydro-Produkt, das nicht identifiziert werden konnte, entsprechen.

Substanz J wurde im Papierchromatogramm mit Subst. A aus *Stroph. mirabilis*<sup>21</sup> verglichen. Das zur Verfügung stehende kristallisierte Präparat der letzteren Substanz zeigte im Papierchromatogramm (System n-Butanol-Toluol-(1:4)-Wasser) zwei dicht beieinander liegende Flecken, war also sicher nicht einheitlich. Beim Vergleich im System Chloroform-Formamid war nach 48 Std. ein deutlicher Unterschied der Rf-Werte sichtbar, so dass eine Identität nicht in Frage kommt.

Tab. 2 (S. 2118) bringt eine Zusammenstellung der spez. Drehungen einer Reihe von Glykosiden, aus der der Unterschied der spez. Drehungen zwischen dem normalen Cardenolid-Derivat, sowie der entsprechenden an C-17 isomeren Allo-Verbindung ersichtlich ist.

Der Wechsel von der normalen zur Allo-(17 $\alpha$ )-Form bewirkt somit ein positives Drehungsincrement, während die gleiche strukturelle Änderung bei den entsprechenden Ätiansäure-methylestern (auch bei denjenigen mit Cis-Verknüpfung der Ringe C–D) einen negativen Wert zwischen  $-80^{\circ}$  und  $-195^{\circ}$  bedingt.

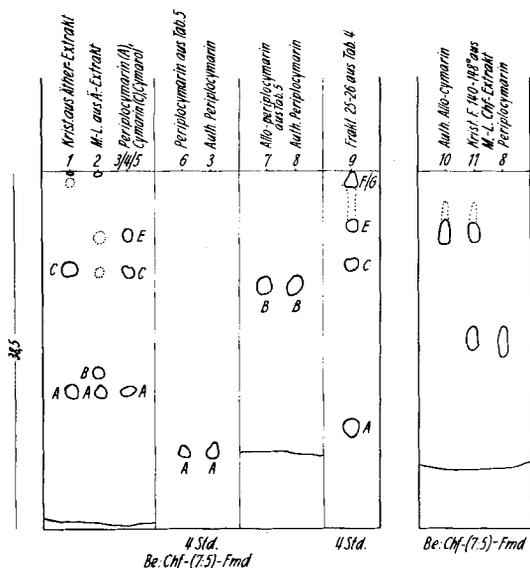


Fig. 1.

<sup>20</sup> A. Rheiner, A. Hunger & T. Reichstein, *Helv.* **35**, 687 (1952).

<sup>21</sup> E. Primo & Ch. Tamm, *Helv.* **37**, 141 (1954).

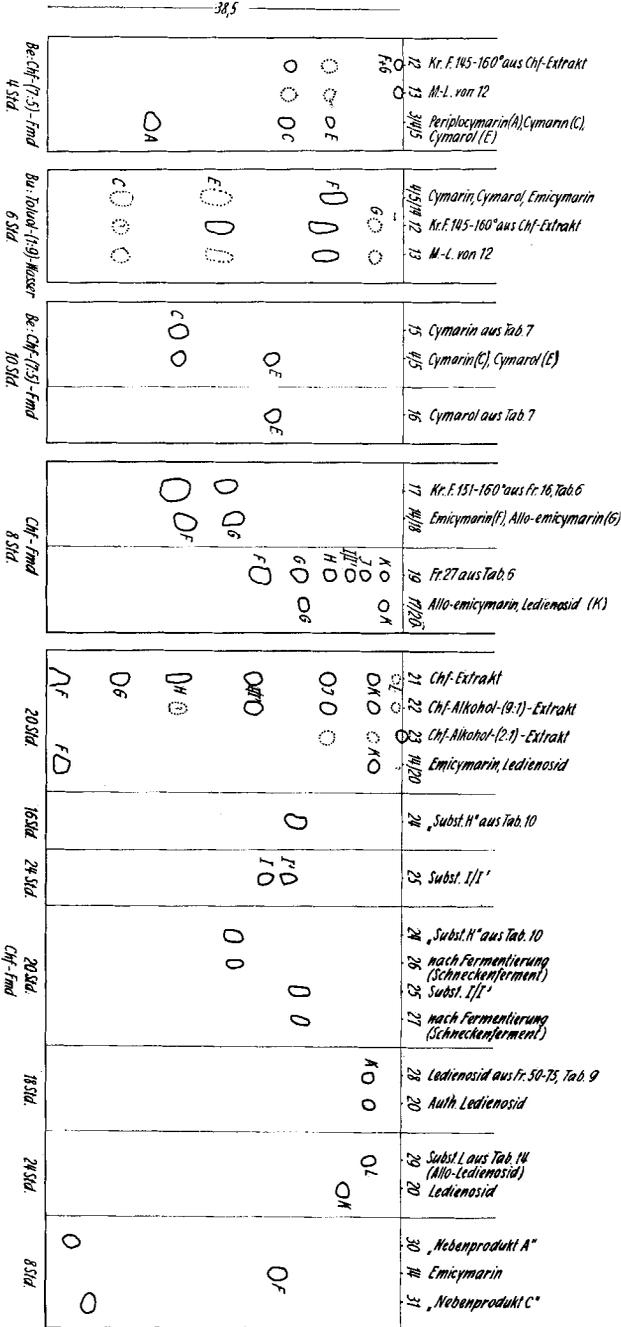


Fig. 2.

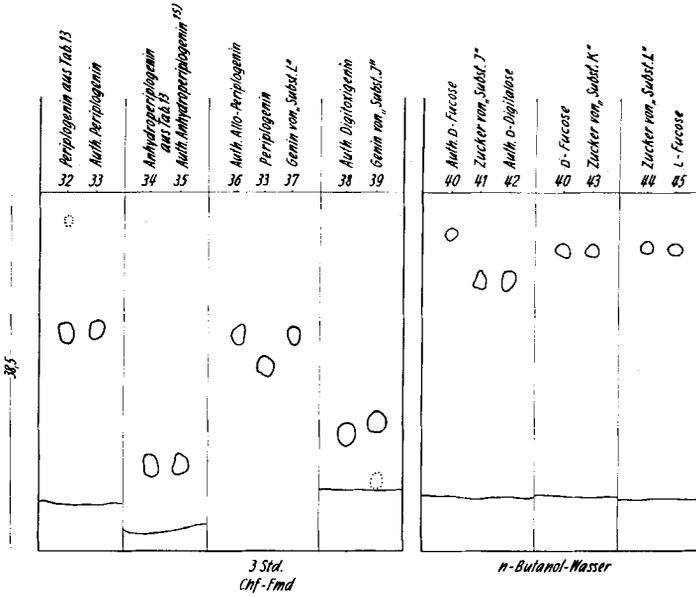


Fig. 3.

Fig. 1—3 (Papierchromatogramme).

- 1 0,15 mg Kristalle aus Äther-Extrakt
- 2 0,15 mg Mutterlauge aus Äther-Extrakt
- 3 0,03 mg authentisches Periplocymarin
- 4 0,03 mg authentisches Cymarin
- 5 0,03 mg authentisches Cymarol
- 6 0,03 mg Periplocymarin aus Fraktionen 13—16, Tab. 5
- 7 0,03 mg Allo-periplocymarin aus Fraktionen 1—2, Tab. 5
- 8 0,03 mg authentisches Allo-periplocymarin
- 9 0,10 mg Gemisch von Periplocymarin, Cymarin, Cymarol, Emicymarin und Allo-emicymarin aus Frakt. 25—26, Tab. 4
- 10 0,03 mg authentisches Allo-cymarin
- 11 0,05 mg Gemisch von Allo-periplocymarin und Allo-cymarin aus Mutterlauge des Chf-Extraktes, vgl. S. 2121.
- 12 0,10 mg Kristalle F. 145—160° aus Chloroform-Extrakt
- 13 0,10 mg Mutterlauge von 12
- 14 0,03 mg authentisches Emicymarin
- 15 0,03 mg Cymarin aus Frakt. 1, Tab. 7
- 16 0,03 mg Cymarol aus Frakt. 8—10, Tab. 7
- 17 0,05 mg Gemisch von Emicymarin und Allo-emicymarin aus Frakt. 16, Tab. 6
- 18 0,03 mg authentisches Allo-emicymarin
- 19 0,10 mg Frakt. 27 aus Tab. 6
- 20 0,03 mg authentisches Ledienosid
- 21 0,15 mg Chloroform-Extrakt aus Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt
- 22 0,15 mg Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt aus Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt
- 23 0,15 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt aus Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt
- 24 0,03 mg Substanz H aus Tab. 10
- 25 0,03 mg Subst. I/I' aus präparativer Papierchromatographie der Frakt. 72—105, Tab. 9
- 26 0,03 mg Substanz H

- 27 0,03 mg Substanz I/I'  
 28 0,03 mg Ledienosid aus Frakt. 50—75, Tab. 9  
 29 0,03 mg Subst. L (Allo-Ledienosid) aus Frakt. 18, Tab. 14  
 30 0,03 mg „Nebenprodukt A“<sup>1)</sup>  
 31 0,03 mg „Nebenprodukt C“<sup>1)</sup>  
 32 0,03 mg Periplogenin aus Frakt. 30, Tab. 13  
 33 0,03 mg authentisches Periplogenin  
 34 0,03 mg Anhydroperiplogenin aus Frakt. 21—25, Tab. 13  
 35 0,03 mg Anhydroperiplogenin<sup>15)</sup>  
 36 0,03 mg authentisches Allo-Periplogenin  
 37 0,03 mg Allo-Periplogenin aus Hydrolyse von Subst. L  
 38 0,03 mg authentisches Digitoxigenin  
 39 0,03 mg Genin-Teil aus Hydrolyse von Subst. J  
 40 0,05 mg authentische D-Fucose  
 41 0,05 mg Zucker-Teil aus Hydrolyse von Subst. J  
 42 0,05 mg authentische D-Digitalose  
 43 0,05 mg D-Fucose aus Hydrolyse von Ledienosid  
 44 0,05 mg Zucker-Teil aus Hydrolyse von Allo-ledienosid  
 45 0,05 mg authentische L-Fucose

Tabelle 2.

Substanz	[M] <sub>D</sub> des normalen 17β-Cardenolid- Derivates	[M] <sub>D</sub> der entspr. Allo-Verbindung mit 17-α-Konfiguration	[M] <sub>D</sub> (17α—17β)
Cymarín . . . .	+ 210 ± 11 (Chf) <sup>9)</sup> 23)	+ 236 ± 12 (Me) <sup>23)</sup>	+ 26 ± 23
Periplocymarín .	+ 146 ± 11 (Me) <sup>8)</sup> 22)	+ 252 ± 11 (Me) <sup>7)</sup> 22)	+ 106 ± 22
Emicymarín . . .	+ 68 ± 11 (Me) <sup>23)</sup>	+ 160 ± 8 (Me) <sup>15)</sup>	+ 92 ± 19
Periplogenin . .	+ 113 ± 6 (Me)	+ 160 ± 8 (Me)	+ 47 ± 14
Ledienosid . . .	+ 25 ± 8 (Me) <sup>11)</sup> 22)	+ 47 ± 20 (Me) <sup>22)</sup>	+ 22 ± 28

Im Papierchromatogramm zeigten die Allo-(= 17α)-Verbindungen in allen hier geprüften Systemen eine etwas kürzere Laufstrecke als die entsprechenden 17β-Verbindungen; im Unterschied hiezu wurden die ersteren von Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> leichter eluiert.

Wie sich im Papierchromatogramm (vgl. 30, 31 und 14 in Fig. 2) zeigen liess, war keines der hier neu isolierten Glykoside identisch mit den von A. Lardon erhaltenen Nebenprodukten A oder C.

Wir danken Herrn Prof. T. Reichstein, unter dessen Leitung diese Arbeit ausgeführt wurde, für die Überlassung der Droge sowie sein Interesse. Der eine von uns (R. Z.) dankt Herrn Prof. M. F. Jayle und dem Centre national de la Recherche scientifique (Paris) bestens für die Unterstützungen, welche ihm die Teilnahme an dieser Untersuchung ermöglichten.

### Experimenteller Teil.

Die Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis 200° etwa ± 2°, darüber etwa ± 3°. Substanzproben zur Bestimmung der Drehung und zur Aufnahme der UV.-Abs.-Spekt. wurden 45 Min. bei 60° und 0,1 Torr getrocknet, zur Analyse 5 Std. bei 0,01 Torr und 100° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mit Einwaage im Schweinchen. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum,

<sup>22)</sup> Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

<sup>23)</sup> W. A. Jacobs, J. biol. Chemistry **88**, 519 (1930).

Zusatz von Wasser, Ausschütteln mit Chf-Ae, Waschen mit verd. HCl, Sodalösung und Wasser, Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Eindampfen im Vakuum. Ausführung der Chromatogramme nach der Durchlaufmethode<sup>24</sup>) an alkalifreiem  $\text{Al}_2\text{O}_3$ <sup>25</sup>) oder  $\text{SiO}_2$  (Korngrösse 0,15–0,3 mm), der *Keller-Kiliani*-Reaktion<sup>17</sup>) und der Papierchromatographien<sup>26</sup>)<sup>27</sup>) nach früheren Angaben. Für Lösungsmittel gelten die folgenden Abkürzungen: Ae = Äther, An = Aceton, Al = 95-proz. Äthanol, Be = Benzol, Bu = n-Butanol, Chf = Chloroform, Fmd = Formamid, Me = Methanol, To = Toluol, W = Wasser, AcOH = Eisessig.

Masse der Samen (Durchschnittswerte von 50 Samen). Länge: 1,5 cm; Breite: 0,4 cm; Dicke: 0,18 cm; Gewicht: 0,042 g; Länge des Haarschopfes: 9,8 cm; 1 Pericarp-Hälfte enthielt 164 Samen (Einzelbestimmung).

*Pericarp* (Durchschnittswerte von 10 Pericarp-Hälften): 26,1 cm; Breite: 3,4 cm; Gewicht (inkl. Samen): 23,7 g; Gewicht leer: 14,2 g.

Extraktion der Samen. 1000 g der vom Haarschopf befreiten Samen wurden nach früherer Methode<sup>5</sup>) extrahiert und dabei die in Tabelle 3 aufgeführten Extrakte erhalten.

Tabelle 3.

Extrakt	Ausbeute aus 1 kg Samen	% des Samen- gewichtes
Petrolätherextrakt . . . . .	278 g	27,8
Ätherextrakt (roh) . . . . .	8,2 g	0,82
Chloroformextrakt . . . . .	20,95 g	2,10
Chloroform-Alkohol-(2:1) . . . . .	5,44 g	0,54

Untersuchung des Ätherextraktes. 8,2 g Ätherextrakt gaben aus Me-Ae 2,83 g Kristalle, Smp. 131–136° (Papierchromatogramm vgl. 1 in Fig. 1, Flecken A und C). Die eingeeingte Mutterlauge gab aus Me-Ae weitere 0,824 g Kristalle, Smp. 134–139° (Papierchromatogramm, Flecken A, C und E). Der Mutterlauge Rückstand, 4,4 g, Papierchromatogramm vgl. 2 in Fig. 1, wurde an 130 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 440 cm<sup>3</sup> der in Tabelle 4 angegebenen Lösungsmittel.

Die *Kedde*-negativen Kristalle aus den Fraktionen 3 und 4, 9 bzw. 8 mg, wurden nicht untersucht.

Nur aus der Fraktion 14 konnte ein papierchromatographisch einheitliches, kristallisiertes Produkt gewonnen werden. Aus Me-Ae wurden 48 mg farblose Nadeln, Smp. 130–133° erhalten. Allo-periplocyamarin (Flecken B).

Die Mutterlaugeprodukte des Umkristallisierens der Kristalle aus Fraktion 14 wurden mit den Kristallen und Mutterlaugeprodukten der Fraktionen 15–18 vereinigt (total 1,06 g) und an 32 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 100 cm<sup>3</sup> der in Tabelle 5 aufzeichneten Lösungsmittel.

Die Fraktionen 1–2 gaben aus Me-Ae 44 mg Blättchen, nach dem Umkristallisieren aus Me-Ae Smp. 128–131°; Papierchromatogramm: Flecken B (Allo-periplocyamarin), vgl. 7 in Fig. 1.

Die Fraktionen 13–27 gaben aus Me-Ae 106 mg Spiesse, nach dem Umkristallisieren aus Me-Ae Smp. 134–138°; im Papierchromatogramm: einheitlich Flecken A (Periplocyamarin) (vgl. 6 in Fig. 1).

Aus allen übrigen Fraktionen konnte kein im Papierchromatogramm einheitliches Produkt erhalten werden.

<sup>24</sup>) T. Reichstein & C. W. Shoppee, Disc. Transact. Faraday Soc. **1949**, Nr. 7, 305.

<sup>25</sup>) J. v. Ew, A. Lardon & T. Reichstein, Helv. **27**, 1292, Fussnote 2 (1944).

<sup>26</sup>) O. Schindler & T. Reichstein, Helv. **34**, 108 (1951).

<sup>27</sup>) E. Schenker, A. Hunger & T. Reichstein, Helv. **37**, 680 (1954).

Tabelle 4.

Nr.	Lösungsmittel	mg Ein- dampf- rückstand	Flecken im Papier- chromatogramm von Kristallen (Kr.) bzw. rohen Fraktionen	Habitus, bei Kristallen Smp. aus Me-Ae
1—2	Be	421	<i>Kedde</i> negativ	Öl
3	Be	57	<i>Kedde</i> negativ	Smp. 137—140°
4	Be	36	<i>Kedde</i> negativ	Smp. 109—130°
5—6	Be	69	<i>Kedde</i> negativ	amorph
7—11	Be:Chf-(80:20)	115	<i>Kedde</i> negativ	amorph
12	Be:Chf-(60:40)	12	<i>Kedde</i> negativ	amorph
13	Be:Chf-(60:40)	19	<i>Kedde</i> schwach positiv	amorph
14	Be:Chf-(60:40)	81	Kr. B	Smp. 114—128°
15—16	Be:Chf-(20:80)	1010	Kr. A, B	Smp. 125—128°
17—19	Be:Chf-(20:80)	151	Kr. A, B+C	Smp. 121—130°
20—22	Chf	34	Kr. A+C	Smp. 126—135°
23	Chf:Me-(99:1)	434	Kr. A, C+Spur F	Smp. 123—131°
24	Chf:Me-(99:1)	92	Kr. E	Smp. 221—224°
25—26	Chf:Me-(99:1)	75	E, F+G	amorph
27—30	Chf:Me-(98:2)	237	F+G	amorph
31—33	Chf:Me-(95:5)	119	F+G	amorph
34—36	Chf:Me-(90:10)	67	F+Spur G	amorph
37—38	Chf:Me-(50:50)	59	<i>Kedde</i> negativ	amorph
39—40	Gemisch mit 1% AcOH	1256	<i>Kedde</i> negativ	amorph
41—42	Gemisch mit 2% AcOH	360	<i>Kedde</i> negativ	Smp. 215—220°

Tabelle 5.

Nr.	Lösungsmittel	mg Ein- dampf- rückstand	Flecken im Papierchrom- matogramm der Kristalle	Habitus, bei Kristallen Smp. aus Me-Ae
1—2	Be-Chf-(70:30)	136	B	Blättchen 120—131°
3—7	Be-Chf-(70:30)	281	A+B	Prismen u. Nadeln 127—132°
8—12	Be-Chf-(60:40)	132	A+B	Prismen u. Nadeln 127—132°
13—16	Be-Chf-(60:40)	113	A	Nadeln 133—137°
17—22	Be-Chf-(40:60)	161	A	Nadeln 133—137°
23—27	Be-Chf-(20:80)	82	A	Nadeln 133—137°
28—29	Chf	87	A+C	Prismen u. Nadeln 130—138°
30	Chf	5	A+C	amorph
31—32	Chf-Me-(99:1)	7	A+C	amorph

Untersuchung des Chloroformextraktes. 20,95 g Chf-Extrakt gaben aus Me-Ae 3,3 g Kristalle, Smp. 145—160°; im Papierchromatogramm (vgl. 12 in Fig. 2) zeigten diese die Flecken C, E, F und G. Der Mutterlaugen-Rückstand zeigte im Papierchromatogramm die gleiche Zusammensetzung (vgl. 13 in Fig. 2). Er wurde in zwei Portionen, einer ersten von 3,0 g und einer zweiten von 14,6 g, an  $Al_2O_3$  chromatografiert.

Im folgenden wird die Chromatographie der Portion mit 14,6 g an 250 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  beschrieben; zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 1000  $\text{cm}^3$  der in nachfolgender Tabelle 6 aufgeführten Lösungsmittel.

Tabelle 6.

Nr.	Lösungsmittel	mg Ein- dampf- rückstand	Flecken im Papierchromatogramm	Habitus, bei Kristallen Smp. aus Me-Ae
1	Be-Chf-(20:80)	2558	C + D	Nadeln 135—140°
2—5	Be-Chf-(20:80)	2369	C + E	Prismen, Nadeln, Blättchen 222—236°
6	Chf	345	C, E, F, G	Blättchen 219—225°
7—15	Chf	4088	F + G	Prismen und Blättchen 157—162°
16	Chf-Me-(98:2)	2074	F + G	Blättchen 154—160°
17—18	Chf-Me-(98:2)	612	F	Blättchen 155—160°
19	Chf-Me-(98:2)	163	F + I	Blättchen 155—169°
20—23	Chf-Me-(90:10)	1238	F, H, I, J	amorph
24—28	Chf-Me-(50:50)	321	F, G, H, I, J, K	amorph

Aus dieser Chromatographie konnte nur aus den Fraktionen 17—18 ein papierchromatographisch einheitliches kristallisiertes Produkt erhalten werden. Aus Me-Ae 480 mg Emicymarin (Flecken F), Smp. 155—160°. Beim Umkristallisieren der Kristalle aus Me-Ae blieb der Smp. unverändert.

Die analoge Chromatographie von 3,0 g Mutterlaugenrückstand gab: 25 mg kristallisiertes Gemisch von Allocymarin (Flecken D) und Allo-periplocymarin (Flecken B), Smp. 140—148° (vgl. 11 in Fig. 1).

270 mg krist. Gemisch von Cymarin (Flecken C), Allo-cymarin (Flecken D) und Emicymarin (Flecken F), Smp. 129—136°.

281 mg krist. Gemisch von Cymarin (Flecken C), Cymarol (Flecken E) und Emicymarin (Flecken F); der Smp. davon war z. T. 122—126°, z. T. 207—210°.

225 mg krist. Gemisch aus Cymarol (Flecken E) und Emicymarin (Flecken F), Smp. 222—234°.

997 mg krist. Gemisch aus Emicymarin (Flecken F) und Allo-emicymarin (Flecken G), Smp. 154—159°.

359 mg amorphe Fraktionen bestehend aus Emicymarin (Flecken F), Allo-emicymarin (Flecken G) sowie den Substanzen H, I, J und K.

3,3 g aus dem Chf-Extrakt erhaltene Kristalle, Smp. 145—160°, wurden an 100 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 330  $\text{cm}^3$  der in Tabelle 7 aufzeichneten Lösungsmittel.

Die Fraktion 1 gab aus Me-Ae 459 mg krist. Cymarin; nach Umkristallisieren aus Me-Ae Smp. 138—140°.

Die Fraktionen 2—7 gaben aus Me-Ae 623 mg Kristalle von unterschiedlichem Smp., die im Papierchromatogramm die Flecken von Cymarin (C) und Cymarol (E) zeigten.

Aus den Fraktionen 8—10 wurden 82 mg Cymarol, Smp. nach Umkristallisieren aus Me-Ae 235—239°, erhalten.

Die Fraktion 11 gab aus Me-Ae Kristalle, bestehend aus einem Gemisch von Cymarol und Emicymarin. Mit Aceton konnte aus diesem Gemisch nur Emicymarin in Lösung gebracht werden; die ungelösten Anteile bestanden aus reinem Cymarol, Smp. 235—242°. Die acetone Lösung wurde eingedampft und der Rückstand aus Me-Ae kristallisiert; dabei wurden farblose Blättchen, Smp. 159—163°, von reinem Emicymarin (Flecken F) erhalten.

Tabelle 7.

Nr.	Lösungsmittel	mg Ein- dampf- rückstand	Flecken im Papierchromatogramm	Habitus, bei Kristallen Smp. aus Me-Ae
1	Be-Chf.(20:80)	588	Kr: C	Nadeln, Smp. 129—138°
2—4	Be-Chf.(20:80)	256	Kr: C + E	z.T. 119—138°, z.T. 180—190°, z.T. 205—212°
5—7	Chf	544	Kr: C + E	Smp. 216—229°
8—10	Chf	144	Kr: E	Smp. 234—238°
11	Chf-Me-(99:1)	241	Kr: E + F	Blättchen, Smp. 153—160°
12—18	Chf-Me-(99:1)	1326	Kr: F	Blättchen, Smp. 155—163°
19—21	Chf-Me-(98:2)	152	Kr: F	Blättchen, Smp. 151—161°
22	Chf-Me-(98:2)	1,5	F + G + H	amorph
23—24	Chf-Me-(95:5)	72	F + G + H	Blättchen, Smp. 154—158°
25—27	Chf-Me-(95:5)	41	F + G + H + Spur I	amorph
28—30	Chf-Me-(90:10)	22	F + G + H	amorph

Aus den Fraktionen 12—21 wurde aus Me-Ae reines Emicymarin, Smp. 156—160°, erhalten. Inkl. die Kristalle aus Fraktion 11 wurden von Emicymarin insgesamt 1,437 g erhalten.

Die Fraktionen 22 und 25—30 konnten nicht kristallisiert werden; sie zeigten im Papierchromatogramm die Flecken F (Emicymarin), G (Allo-emicymarin), H und I.

Die amorphen Fraktionen 20—28 der in Tabelle 6 beschriebenen Chromatographie sowie die Fraktionen 23—30 aus Tabelle 7, insgesamt 1,67 g, versuchte man durch Verteilungschromatographie zu trennen (s. Tab. 8). Hierzu diente Propylenglykol-W-(1:4) als stationäre Phase und Chf als mobile Phase. Als Trägersubstanz der stationären Phase diente Kieselgur (Hyflo-Super-Cel). Dabei wurden 400 g gereinigtes Hyflo-Super-Cel mit 400 cm<sup>3</sup> stationärer Phase homogen vermischt und in ein Rohr Nr. 2 eingefüllt. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 20 cm<sup>3</sup>/Std.; es wurden Fraktionen von 120 cm<sup>3</sup> aufgefangen; Temperatur 18°.

Tabelle 8.

Nr.	mg Eindampf- rückstand	Flecken im Papierchromatogramm der rohen Fraktionen
1—6	1280	F, G, H, I
7—10	78	H, I + J
11	11	J, Spuren H + I
12	6	J
13—17	9	J + K
18—50	23	K

Aus keiner der Fraktionen war es möglich, Kristalle zu erhalten. Das Gemisch aus den Fraktionen 7—10 und 13—17, 87 mg, wurde auf 16 Bogen *Whatman* No. 1 verteilt und durch eine präparative Papierchromatographie (Dauer 30 Std.) im System Chf-Fmd zerlegt. Aus den nach üblicher Methode eluierten Zonen liessen sich nach chromatographischer Reinigung an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in papierchromatographischer Form erhalten: 50 mg

Substanz H, 6 mg Substanz J. Die Substanz I war begleitet von einer im Papierchromatogramm um wenig kürzer laufenden Substanz I'. Aus keiner der Fraktionen liessen sich bisher Kristalle erhalten.

Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt. Im Papierchromatogramm (vg. 21, 22, 23 in Fig. 2) zeigte dieser Extrakt die Flecken H, I, J, K und einen Flecken, der an der Startlinie stehen blieb.

5,317 g Chf-Al-(2:1)-Extrakt wurden in 25 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und mit 2-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 5 gestellt. Diese Lösung wurde viermal mit je 50 cm<sup>3</sup> Chf, dann viermal mit je 50 cm<sup>3</sup> Chf-Al-(9:1) und zwölfmal mit je 50 cm<sup>3</sup> Chf-Al-(2:1) ausgeschüttelt. Die mit je 5 cm<sup>3</sup> 2-n. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und W (zweimal) gewaschenen Auszüge wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft. Dabei wurden die folgenden Extrakte erhalten:

Ausschüttelbar mit	mg	Flecken im Papierchromatogramm vgl. Fig. 2
Chf . . . . .	786	F, G, H, I, J, K + Spuren L
Chf-Al-(9:1) . . . . .	616	Spuren H, I, J, K + L
Chf-Al-(2:1) . . . . .	3888	Spuren J + Spuren K + polarere Glykoside

590 mg der mit Chf-Al-(9:1) ausschüttelbaren Anteile wurden an einer Säule (Dimensionen des Rohres: Länge 75 cm, Durchmesser 3,5 cm) bereitet aus 210 g Kieselgur (Hyflo-Super-Cel) imprägniert mit 210 cm<sup>3</sup> W, einer Verteilungschromatographie unterworfen. Lösungsmittel s. Tabelle 9. Es wurden Fraktionen zu 20 cm<sup>3</sup> aufgefangen, die Laufgeschwindigkeit betrug 5 cm<sup>3</sup>/Std.; Temperatur 18–20°.

Tabelle 9.

Nr.	Lösungsmittel	mg Eindampfrückst.	Flecken im Papierchromatogramm	Habitus, bei Kristallen Smp. aus Me-Ae
1—6	Be-Bu-(6:1)	12	<i>Kedde</i> negativ	amorph
7—10	Be-Bu-(6:1)	142	<i>Kedde</i> negativ	amorph
11—33	Be-Bu-(6:1)	134	F, G, H, I, I', J, K	amorph
34—42	Be-Bu-(6:1)	29	J, K	amorph
43—49	Be-Bu-(6:1)	28	I, J, K	amorph
50—71	Be-Bu-(6:1)	148	K + Spuren J	Blättchen Smp. 164—169°
72—88	Be-Bu-(6:1)	18	I, I', Spuren K + L	amorph
89—96	Be-Bu-(4:1)	7	I, Spuren K + L	amorph
97—105	Be-Bu-(4:1)	15	I, I', J, L, Spuren H + K	amorph
106—124	Be-Bu-(4:1)	16	J, K, L	amorph
125—143	Be-Bu-(2:1)	31	J, K, L	amorph
144—149	Be-Bu-(2:1)	34	J, L, Spuren K	amorph
150—162	Be-Bu-(2:1)	21	J, K, Spuren L	amorph

Die Fraktionen 50—61 gaben aus Me-Ae 61,5 mg Ledienosid, F. 164—169°; Papierchromatogramm: Flecken K begleitet von Spuren von J.

Aus den Fraktionen 63—64 wurden aus Me-Ae 9,7 mg Kristalle der Substanz K mit den gleichen Eigenschaften wie diejenigen aus 50—61 erhalten.

Die Fraktionen 65—71 gaben aus Me-Ae noch 2,4 mg krist. Subst. K.

Die Fraktionen 72—88, 89—96, 97—105, 125—143, 144—149 sowie die Mutterlaugen der Fraktionen 50—71 wurden getrennt durch präparative Papierchromatographie zerlegt. Stationäre Phase Fmd, mobile Phase Chf. Laufzeit 30 Std. Methodik nach früherer Vorschrift<sup>12</sup>). Dabei wurden die folgenden papierchromatographisch einheitlichen Eluate erhalten: 29,5 mg Substanz J, amorph; 30,5 mg Substanz K; 14,5 mg Substanz L.

Ausser diesen papierchromatographisch reinen Fraktionen wurden noch 8 mg Eluate der Substanz I erhalten. Bei längerer Laufzeit liess sich dieses Material aber in zwei sehr nahe beieinander liegende Flecke I und I' auflösen (vgl. Nr. 25, Fig. 2). Wegen der geringen Menge wurde es lediglich für Versuche zur Spaltung mit zwei Fermenten verwendet (siehe unten).

Untersuchung der 29,5 mg Eluate entspr. Substanz J siehe weiter unten.

30,5 mg Eluate der Substanz K gaben nach chromatographischer Reinigung an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  12 mg Kristalle, Smp. 164—167°.

14,5 mg Eluate der Substanz L gaben nach chromatographischer Reinigung an Silicagel 3 mg farblose Nadeln, Smp. 178—184°.

#### Beschreibung der isolierten, einheitlichen Substanzen.

*Periplocyarin* (Substanz A): Die aus der in Tab. 5 beschriebenen Chromatographie erhaltenen Kristalle, Smp. 133—137°, gaben bei der Mischprobe mit authentischem Periplocyarin keine Smp.-Depression;  $[\alpha]_D^{25} = +27,4^0 \pm 2^0$  ( $c = 1,023$  in Me).

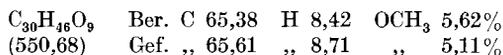
Die Farbreaktion mit 84-proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  war gleich wie diejenige von authentischem Periplocyarin; ebenso waren die Laufstrecken im Papierchromatogramm gleich; vgl. 6 in Fig. 1.

*Alloperiplocyarin* (Substanz B): Die aus der in Tab. 5 beschriebenen Chromatographie erhaltenen Kristalle, Smp. 128—131°, gaben bei der Mischprobe mit authentischem Allo-periplocyarin keine Smp.-Depression;  $[\alpha]_D^{25} = +47,1^0 \pm 2^0$  ( $c = 1,0312$  in Me); identifiziert mit Hilfe der Farbreaktion mit 84-proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und Papierchromatogramm (vgl. 7 in Fig. 1).

*Cyarin* (Substanz C): Die aus der in Tab. 7 beschriebenen Chromatographie erhaltenen Kristalle, Smp. 138—140° gaben bei der Mischprobe mit authentischem Cyarin keine Smp.-Depression;  $[\alpha]_D^{25} = +38,3^0 \pm 2^0$  ( $c = 1,137$  in Chf); identifiziert mit Hilfe der Farbreaktion mit 84-proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und Papierchromatogramm (vgl. 15 in Fig. 2).

*Cymarol* (Substanz E): Die aus der in Tab. 7 beschriebenen Chromatographie erhaltenen Kristalle, Smp. 235—239° gaben bei der Mischprobe mit authentischem Cymarol keine Smp.-Depression;  $[\alpha]_D^{25} = +31,4^0 \pm 2^0$  ( $c = 1,095$  in Me); identifiziert mit Hilfe der Farbreaktion mit 84-proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und Papierchromatogramm (vgl. 16 in Fig. 2).

*Emicyarin* (Substanz F): Die aus den Fraktionen 12—21 der in Tab. 7 beschriebenen Chromatographie, sowie diejenigen aus den Fraktionen 17—18 der in Tab. 6 beschriebenen Chromatographie waren untereinander identisch; sie wurden zusammen aus Me-Ae umkristallisiert, Blättchen vom Smp. 157—163°;  $[\alpha]_D^{25} = +12,3^0 \pm 2^0$  ( $c = 0,9554$  in Me).



*Di-O-acetyl-emicyarin*: 20 mg Emicyarin, Smp. 156—160°, wurden in 0,6 cm<sup>3</sup> Pyridin und 0,5 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid 48 Std. auf 32° erwärmt. Die übliche Aufarbeitung gab 33 mg neutrales Rohprodukt; aus An-Ae 23 mg Blättchen, Smp. 270—273°;  $[\alpha]_D^{25} = +25,5^0 \pm 2^0$  ( $c = 1,078$  in Chf). Misch-Smp. mit authentischem Material ohne Depression.

*Substanz H*. Die dem Flecken H entsprechenden Eluate der präparativen Papierchromatographie (50 mg) wurden an 1,5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Zum Eluieren jeder Fraktion dienten je 5 cm<sup>3</sup> der in Tabelle 10 angegebenen Lösungsmittel.

Tabelle 10.

Nr.	Lösungsmittel	mg Eindampf- rückstand
1—3	Chf	3,6
4—9	Chf-Me-(98:2)	30
10—13	Chf-Me-(95:5)	16,5
14—17	Chf-Me-(90:10)	2
18—19	Chf-Me-(50:50)	3

Alle Fraktionen waren *Kedde*-positiv; aus keiner konnten jedoch bisher Kristalle erhalten werden.

Die Fraktionen 1—9 (Papierchromatogramm vgl. 24 in Fig. 2) und diejenigen von 10—19 wurden vereinigt. Sowohl die Substanz aus den Fraktionen 1—9 als auch diejenige aus 10—19 gab positive *Keller-Kiliani*-Reaktion (blau) und positive Xanthhydrol-Probe (rot).

*Spaltungsversuch von Substanz H mit Strophanthobiase und „Schneckenferment“.* a) 1 mg Substanz H und 5 mg Strophanthobiase wurden in 0,5 cm<sup>3</sup> W gelöst, mit 1 Tropfen To überschichtet und 10 Tage auf 32° erwärmt. Dann wurden mit 5 cm<sup>3</sup> Al versetzt und durch eine Schicht Kieselgur (Hyflo-Super-Cel) filtriert. Die Filtrate wurden im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde im Papierchromatogramm geprüft (vgl. 21, 23 in Fig. 2).

b) 1 mg Substanz H und 5 mg „Schneckenferment“ liess man in der gleichen Art wie unter a) beschrieben 5 Tage reagieren. Papierchromatographische Prüfung vgl. 26 in Fig. 2.

*Versuch zur Hydrolyse von H mit 0,05-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.* 2 mg Subst. H wurden in 1 cm<sup>3</sup> Me und 1 cm<sup>3</sup> 0,1-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde 1 cm<sup>3</sup> W zugegeben und das Me im Vakuum abdestilliert. Die wässrige Lösung wurde 30 Min. auf 65° erwärmt und nach dem Abkühlen dreimal mit je 10 cm<sup>3</sup> Chf ausgeschüttelt. Die Chf-Auszüge wurden mit je ca. 2 cm<sup>3</sup> W, 10 proz. KHCO<sub>3</sub> und wieder W gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft; Rückstand 1,5 mg. Die wässrige Lösung und das erste Waschwasser wurden vereinigt, im Vakuum von Chf-Resten befreit und an einer Säule von Amberlite IR-4 B neutralisiert. Die wässrige Lösung wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand gab im Papierchromatogramm keine Reaktionen auf reduzierende Zucker.

*Acetylierungsprodukt von H.* 16 mg Subst. H wurden in 0,4 cm<sup>3</sup> Pyridin und 0,3 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid zwei Tage bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 18 mg neutrales Rohprodukt, das an 0,7 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert wurde. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 1,8 cm<sup>3</sup> der in Tabelle 11 angegebenen Lösungsmittel.

Tabelle 11.

Nr.	Lösungsmittel	mg Eindampf- rückstand
1—3	Be-Chf-(80:20)	0,5
4—6	Be-Chf-(60:40)	1,5
7—9	Be-Chf-(20:80)	5
10—12	Chf	4
13—15	Chf-Me-(95:5)	7
16—17	Chf-Me-(90:10)	0,5

Aus keiner der Fraktionen konnten bis jetzt Kristalle erhalten werden.

Farbreaktionen mit 84-proz.  $H_2SO_4$ : gelbgrün (1'—5'), gelbbraun (5'—15'), braun (15'—120'). Zur Drehung wurde das amorphe Material der Fraktionen 4—9 (Tab. 10) verwendet;  $[\alpha]_D^{27} = +20,36^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,031$  in Me); das gleiche Material diente zur Aufnahme des UV.-Abs. Spektrums (vgl. Fig. 4).

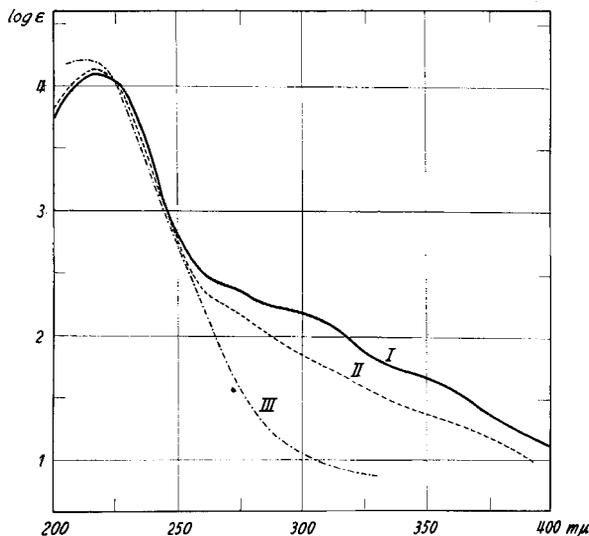


Fig. 4.

UV.-Absorptionsspektren in Alkohol<sup>28)</sup>.

- Kurve I: Substanz H, amorph, isoliert durch präparative Papierchromatographie, Maximum bei 217  $m\mu$ ,  $\log \epsilon = 4,08$ , ber. auf  $C_{29}H_{44}O_7$  (504,35).  
 Kurve II: Substanz J, amorph, isoliert durch präparative Papierchromatographie, Maximum bei 217  $m\mu$ ,  $\log \epsilon = 4,12$ ; ber. auf  $C_{30}H_{46}O_8$  (534,67).  
 Kurve III: Mono-anhydroperiplogenin aus Hydrolyse von Ledenosid, Maximum bei 213  $m\mu$ ,  $\log \epsilon = 4,31$ ; ber. auf  $C_{23}H_{32}O_4$  (372,48).

*Gemisch der Substanzen I und I'*. 1 mg dieses Gemisches (vgl. präparative Papierchromatographie) wurde, wie bei Subst. H beschrieben, mit Strophanthobiase und „Schneckenferment“ umgesetzt; Papierchromatogramm der Reaktionsprodukte vgl. 25, 27 in Fig. 2).

*Substanz J*. 29,5 mg der amorphen Eluate aus der präparativen Papierchromatographie (vgl. Seite 2124) wurden an 1,2 g Silicagel chromatographiert. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 3  $cm^3$  der in Tabelle 12 beschriebenen Chromatographie.

Die Fraktionen 1—9 waren *Kedde* negativ und wurden nicht weiter untersucht.

Die Fraktionen 12—14 wurden vereinigt; es konnten daraus bisher keine Kristalle erhalten werden;  $[\alpha]_D^{28} = +9,9^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,800$  in Me); das gleiche Material diente zur Aufnahme des UV.-Abs.-Spektrums, vgl. Fig. 4. Xanthhydrol-Probe negativ.

*Spaltung von J nach Mannich*. 0,7 mg Subst. J wurden in 0,2  $cm^3$  An gelöst und mit 0,002  $cm^3$  konz. HCl versetzt. Nach 4 Tagen bei 20° wurde mit 1  $cm^3$  W versetzt und nach Zusatz von 1  $cm^3$  Me 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde das Me im Vakuum abdestilliert und die wässrige Lösung viermal mit je 5  $cm^3$  Chf ausgeschüttelt. Der wie üblich erhaltene, in Chf lösliche neutrale Rückstand wurde im Papierchromatogramm

<sup>28)</sup> Aufgenommen von Herrn Dr. P. Zoller auf einem Unicam-SP-500-Quartz-Spektrophotometer.

geprüft; vgl. 39 in Fig. 3. Die wässrige Lösung sowie das erste Waschwasser wurden vereinigt und mit Amberlite IR-4 B neutralisiert. Papierchromatogramm des Rückstandes der im Vakuum eingedampften Lösung vgl. 41 in Fig. 3.

**Tabelle 12.**

Nr.	Lösungsmittel	mg Eindampf- rückstand
1—4	Chf	6
5—7	Chf-Me-(98:2)	2,9
8—10	Chf-Me-(95:5)	2,4
11—13	Chf-Me-(90:10)	18,1
14—16	Chf-Me-(80:20)	8,2
17—21	Chf-Me-(50:50)	5
22	Me	0,5

*Ledienosid* (Substanz K). Von dieser Substanz wurden insgesamt 85 mg in Form farbloser Blättchen, Smp. 164—169°, erhalten; Mischprobe mit einer authentischen Probe ohne Smp.-Depression;  $[\alpha]_D^{25} = +4,7 \pm 2^{\circ}$  ( $c = 1,261$  in Me).

*Hydrolyse von Ledienosid nach Mannich*. 67 mg Ledienosid, Smp. 164—169°, wurden in 14 cm<sup>3</sup> An gelöst, mit 0,14 cm<sup>3</sup> konz. HCl versetzt und 4 Tage bei 20° stehen gelassen. Nach Zusatz von 14 cm<sup>3</sup> W wurde im Vakuum auf 14 cm<sup>3</sup> konzentriert. Dann wurde mit 14 cm<sup>3</sup> Me versetzt und 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Das Me wurde im Vakuum abdestilliert und die wässrige Lösung viermal mit Chf ausgeschüttelt. Die wie üblich neutral gewaschenen Chf-Auszüge gaben 52 mg neutrales Rohprodukt. Dieses wurde an 2 g Silicagel chromatographiert. Zum Eluieren jeder Fraktion dienten je 5 cm<sup>3</sup> der in Tabelle 13 aufgeführten Lösungsmittel.

**Tabelle 13.**

Nr.	Lösungsmittel	mg Eindampf- rückstand	Habitus, bei Kristallen Smp. aus Me-Ae
1—2	Be-Chf-(50:50)	2,4	amorph
3—5	Be-Chf-(40:60)	0,7	amorph
6—8	Be-Chf-(30:70)	0,8	amorph
9—11	Be-Chf-(20:80)	1,7	amorph
12—14	Be-Chf-(10:90)	0,8	amorph
15—20	Chf	7,0	amorph
21—24	Chf-Me-(99:1)	10,8	amorph
25	Chf-Me-(98:2)	2	Nadeln, Smp. 197—199°
26—28	Chf-Me-(98:2)	1,2	amorph
29	Chf-Me-(95:5)	0,7	amorph
30	Chf-Me-(95:5)	12,5	Smp. 224—226°
31—32	Chf-Me-(95:5)	13,5	Smp. 134—138°
33—36	Chf-Me-(90:10)	5,8	amorph
37—39	Chf-Me-(80:20)	1,3	amorph
40—42	Chf-Me-(50:50)	1,7	amorph
43	Me	6,5	amorph

Die Mutterlauge der Fraktion 25 wurde mit den Fraktionen 16—24 vereinigt. Aus Me-Ae wurden noch 13 mg prismatische Nadeln, Smp. 198—200°, erhalten;  $[\alpha]_D^{25} = -1,0^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,9503$  in Chf). UV.-Abs.-Spektrum vgl. Fig. 4. Vergleich im Papierchromatogramm mit Monoanhydroperiplogenin von *Katz & Reichstein*<sup>15</sup>), vgl. 34 in Fig. 3.

Die Fraktionen 26—29 waren amorph. Nach Papierchromatogramm enthielten sie Monoanhydroperiplogenin, Periplogenin und nicht hydrolysiertes Ledenosid.

Die Fraktion 30 gab aus Me-Ae 10 mg Kristalle, Smp. 224—226°;  $[\alpha]_D^{25} = +24,7^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,8421$  in Me). Mit authentischem Periplogenin wurde keine Smp.-Depression erhalten; Vergleich im Papierchromatogramm siehe Fig. 3.

*Identifizierung des Zuckerteiles aus Ledenosid.* Die mit Chf ausgeschüttelte wässrige Lösung der Hydrolyse von Ledenosid sowie das erste Waschwasser wurden vereinigt und an einer Säule von Amberlite IR-4B neutralisiert. Der nach dem Eindampfen im Vakuum erhaltene Sirup wurde in wenig Me gelöst und durch eine dünne Schicht gewaschenen Kieselgurs (Hyflo-Super-Cel) geklärt und erneut eingedampft. Der farblose Zuckersirup wurde in wenig abs. Al gelöst und mit An bis zur beginnenden Trübung versetzt. Bei 0° wurden nach einigen Tagen 3 mg farblose Blättchen erhalten, Smp. 135—137°, die mit authentischer D-Fucose keine Smp.-Depression gaben; Papierchromatogramm vgl. 43 in Fig. 3.

*p-Bromphenylhydrazon der D-Fucose.* 13 mg Zucker, bestehend aus Mutterlaugenrückstand der krist. D-Fucose, sowie 3 mg amorphem wasserlöslichem Sirup aus der Hydrolyse von Ledenosid zweiter Qualität, wurden in 0,2 cm<sup>3</sup> Me gelöst und mit 13 mg frisch bei 0,01 Torr sublimiertem *p*-Bromphenylhydrazin 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand 1 Std. im Hochvakuum bei 50° getrocknet (23 mg). Dieser wurde in 0,2 cm<sup>3</sup> abs. Al gelöst und mit einem Überschuss an Ae ausgefällt. Die abdekantierte Lösung wurde eingedampft und der Rückstand in der gleichen Art noch einmal ausgefällt. Die vereinigten, mit Ae ausfällbaren Anteile (15 mg) wurden an Silicagel chromatographisch gereinigt. Die mit Chf-Me-(85:15) sowie reinem Me erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und gaben aus Me-Ae 9 mg farblose Nadeln, Smp. 175—177°;  $[\alpha]_D^{25} = +7,8^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,8513$  in Me). Keine Smp.-Depression mit einem authentischen Vergleichspräparat.

*Substanz L.* 14,5 mg der dem Flecken L entsprechenden Eluate der präparativen Papierchromatographie wurden an 750 mg Silicagel chromatographiert. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 1,5 cm<sup>3</sup> der in Tabelle 14 ausgezeichneten Lösungsmittel.

Tabelle 14.

Nr.	Lösungsmittel	mg Eindampf- rückstand	Habitus, bei Kristallen Smp. aus Me-Ae
1—7	Chf	5	amorph
8—12	Chf-Me-(98:2)	2,9	amorph
13—14	Chf-Me-(95:5)	2,4	amorph
15—16	Chf-Me-(90:10)	3,0	amorph
17	Chf-Me-(50:50)	0,8	amorph
18	Chf-Me-(50:50)	5,8	farblose Nadeln, Smp. 178—184°
19	Chf-Me-(50:50)	2,0	farblose Nadeln, Smp. 167—172°
20	Me	1,5	amorph

Die Fraktionen 1—14 waren *Kedde negativ*, verworfen.

Von den *Kedde*-positiven Fraktionen 15—20 gab nur die Fraktion 18 aus Me-Ae 3 mg feine farblose Nadeln, Smp. 178—184°;  $[\alpha]_D^{25} = +8,76^\circ \pm 6^\circ$  ( $c = 0,2788$  in Me). Farbreaktion mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: gelb-orange (1'), orange (5'), rosa (15'), rotviolett (15'), blau (60').

*Hydrolyse von L nach Mannich.* 0,5 mg vom Smp. 178—184° wurden wie üblich nach *Mannich* hydrolysiert; Papierchromatogramm des Aglykon-Teiles vgl. 37 in Fig. 3; Zucker vgl. 44 in Fig. 3.

## Zusammenfassung.

Die Zusammensetzung der digitaloiden Glykoside der Samen von *Strophanthus Eminii* Asch et Pax. wurde mit papierchromatographischer Kontrolle der einzelnen Isolierungsstufen untersucht. Als Hauptglykoside wurden die früher schon erhaltenen Glykoside Cymarin, Cymarol, Periplocymarin und Emicymarin isoliert. Von diesen waren Cymarin, Periplocymarin und Emicymarin von den entsprechenden Allo-(= 17 $\alpha$ -)-Verbindungen begleitet. Daneben wurden amorphe, papierchromatographisch einheitliche Glykoside erhalten, deren Konstitution nicht aufgeklärt werden konnte. Als weiteres Nebenglykosid wurde Ledienosid sowie die entsprechende Allo-Verbindung in kristallisierter Form erhalten. Durch saure Hydrolyse von Ledienosid wurde die früher vermutete Konstitution bestätigt.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

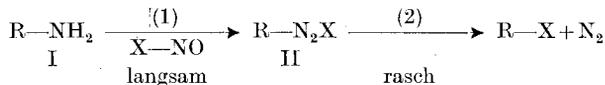
## 222. Über die Desaminierung von Brückenkopf-Aminen.

## 9-Amino-9,10-dihydro-9,10-äthano-anthracen

von M. Wilhelm und D. Y. Curtin.

(30. IX. 57.)

Die Kinetik der Desaminierung primärer aliphatischer und alicyclischer Amine I ist bis heute nur insofern bekannt, als dies die langsam verlaufende Stufe (1) der Diazotierung betrifft. Die nachfolgende Zersetzung (2) der Diazonium-Verbindung II blieb wegen des raschen Reaktionsverlaufes kinetischen Messungen unzugänglich<sup>1)</sup>. Es ist deshalb wünschenswert, nach aliphatischen bzw. alicyclischen Aminen zu suchen, deren entsprechende Diazonium-Verbindungen II sich so langsam zersetzen, dass die Stickstoff-Abspaltung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird, oder deren Diazonium-Salze sogar unzersetzt isoliert werden können.



Wie Untersuchungen von P. D. Bartlett und Mitarb.<sup>2)3)</sup> zeigen, verlaufen nucleophile Substitutionen an Brückenkopf-Atomen bicy-

<sup>1)</sup> Vgl. C. K. Ingold, Structure and Mechanism in Organic Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 1953, S. 398–400.

<sup>2)</sup> J. Amer. chem. Soc. **61**, 3184 (1939).

<sup>3)</sup> Vgl. das Übersichtsreferat von D. E. Applequist & J. D. Roberts Chem. Reviews **54**, 1065 (1954).