

105. Die Cardenolide von *Castilla elastica* CERV.¹⁾

Glykoside und Aglykone, 222. Mitteilung²⁾

von P. Brauchli, O. Schindler und T. Reichstein

(21. III. 61)

Castilla elastica CERVANTES (1794) (*Moraceae*) ist früher als einziger Vertreter der Gattung *Castilla*³⁾ angesehen worden. Nach PITTIER⁴⁾ lassen sich ca. 10 Arten unterscheiden, deren Differenzierung aber teilweise schwierig, und deren taxonomischer Rang nicht sicher umgrenzt ist. Es handelt sich durchwegs um Latex führende, teilweise grosse Bäume, die im tropischen Mittel- und Südamerika, besonders am Fuss der Berge von Mexico bis Peru, Brasilien und Bolivien heimisch sind. *Castilla elastica* CERV. wurde früher vor allem in Mexiko, Mittelamerika und Westindien als Kautschuklieferant («Castilloa-Kautschuk») kultiviert⁵⁾. Wahrscheinlich gehören aber nicht alle unter diesem Namen angebaute Pflanzen tatsächlich dieser Art an⁴⁾^{5e)}. Chemische Untersuchungen beschränkten sich, soweit uns bekannt, bisher auf den Milchsafte⁶⁾. Nach Befunden von BISSET⁷⁾ sind besonders die Samen reich an Cardenoliden. Über genauere Analysen ist uns nichts bekannt. Wir beschreiben im folgenden eine Untersuchung der Cardenolide aus den Samen und dem Milchsafte.

Beschaffung des Ausgangsmaterials. Durch Vermittlung der CIBA-AKTIENGESELLSCHAFT Basel⁸⁾ erhielten wir folgende Proben:

a) 355 g Samen, gesammelt von Pater H. CALLENS im Botanischen Garten, Kisantu (Kongo), am 4. 12. 1958 (Briefe CIBA 21. 11. 58 und 16. 1. 59). Sie erreichten uns im Januar 1959, waren

1) Auszug aus der Diss. P. BRAUCHLI, Basel, die demnächst erscheint.

2) 221. Mitt.: T. GOLAB, HERB. JÄGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 43, 2035 (1960).

3) Die oftmals benützte Schreibweise «*Castilloa*» beruht vielleicht auf einem Schreibfehler und hat keine Berechtigung⁴⁾.

4) H. PITTIER: A preliminary treatment of the genus *Castilla*. Smithsonian Institution U. S. National Museum. Contribution from the U. S. National Herbarium, Vol. 13, part 7 (Washington 1910). Frühere Lit. daselbst.

5) a) E. DE WILDEMAN, *Caoutchouc et Guttapercha* 17, 10431 (1920); *Chem. Zentralbl.* 1920, IV, 344. – b) H. P. STEVENS, *India Rubber World* 100, 27–30, 42 (1939); *Chem. Abstr.* 33, 8439 (1939). – c) H. P. STEVENS, *Rubber Chem. Tech.* 72, 685 (1939); *Chem. Abstr.* 34, 2637 (1940). – d) LUIS CRUZ, *B. Rev. agr.* 76, Nr. 6 (1942); *Chem. Abstr.* 37, 1889 (1943). – e) H. L. MOLDENKE, *Nat. Hist. (New York)* 52, 182–191 (1943); *Biol. Abstr.* 18, 7212 (1944). – f) S. B. HENDRICKS, S. G. WILDEMAN & H. F. McMURDIE, *India Rubber World* 110, 297 (1944); *Chem. Abstr.* 38, 5687 (1944). – g) W. SEIFRIZ, *India Rubber World* 112, 729 (1945); *Chem. Abstr.* 39, 5536 (1945). – h) T. F. FORD, U. S. Patent Nr. 2411033, *Chem. Abstr.* 41, 882 (1947). – i) W. GORDON WHALEY, *Economic Botany* 2, 198 (1948); *Chem. Abstr.* 42, 6147 (1948); H. J. FULLER, *Economic Botany* 5, 311 (1951); *Chem. Abstr.* 46, 1281 (1952).

6) Lit. bis ca. 1934 vgl. C. WEHMER, *Die Pflanzenstoffe*, 2. Aufl., S. 245 (Jena 1929 und Nachträge 1935).

7) Privatmitteilung. Wir danken Herrn N. G. BISSET, damals in Bogor, Java, auch hier bestens für seine Angaben und für sein Einverständnis, uns die genaue Analyse der Pflanze zu überlassen.

8) Wir danken Pater H. CALLENS, Directeur du Jardin GILLET, und Dr. A. GOMEZ POMPA, Ciba Mexico, sowie der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, auch hier bestens für ihre wertvolle Hilfe bei der Beschaffung des Materials.

dann aber bereits stark von Schimmel befallen. Sie wurden sofort bei 35° getrocknet (Gewichtsverlust 115 g) und durch Besprühen mit Chloroform stabilisiert.

b) 3 kg Samen, gesammelt am 15. Juni 1959 im Norden des Staates Veracruz an der Grenze des Staates Puebla unter Aufsicht von Herrn Dr. A. GOMEZ POMPA, Mexico (Briefe vom 22. 4., 30. 6. und 14. 7. 59). Sie trafen am 30. 6. 59 in Basel in sehr gutem Zustand ein und wurden bis zur Extraktion (am 15. 8. 59) bei 20° in verschlossener Büchse aufbewahrt.

c) 4,1 kg Fruchtschalen, gesammelt und spedierte wie Probe b).

d) 13 kg Latex-Alkohol-Chloroform-Gemisch in 9 Flaschen, gesammelt und spedierte wie Probe b). Dies Material entsprach ca. 7,3 kg ursprünglichem Latex, der zur Stabilisierung sofort

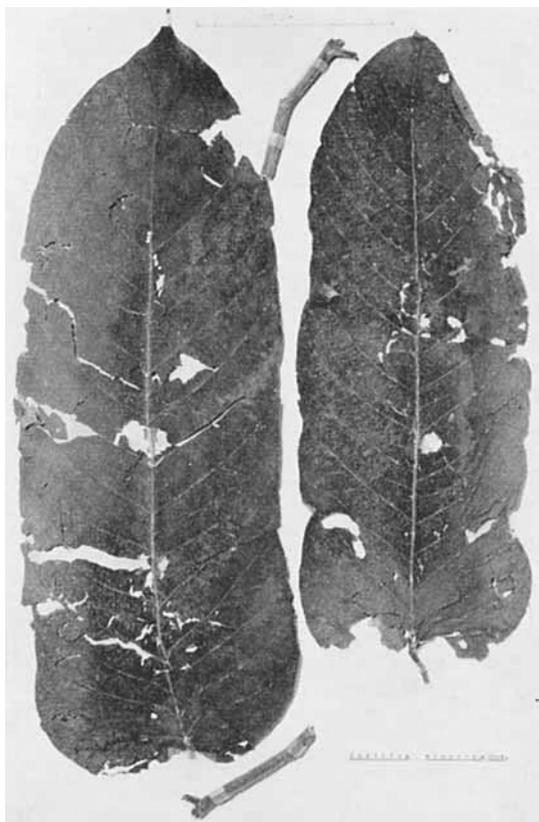


Fig. 1. *Castilla elastica* CERV., Herbarmuster

Gesammelt und bestimmt von Dr. A. GOMEZ POMPA, Januar 1960, Hügel hinter Sebastopol bei Tuxtepec im Staate Oaxaca (Nordgrenze zum Staat Veracruz, Mexico), ca. 20 m hoher Baum in fast immergrünem Wald von *Brosimum*, ca. 80 m ü. M. Die Originaletikette lautet:

Estado de Oaxaca

Col. A. GOMEZ POMPA, No. C. D.

Castilla elastica CERV. Nombre vulgar: Arbol del hule.

Lugar: Cerro atras de Sebastopol (Tuxtepec).

Hab.: Selva alta subperennifolia de *Brosimum*.

Fecha: enero/1960. Det.: A. GOMEZ POMPA.

Observaciones: Arbol, de unos 20 m de altitud.

Colectado a 80 m de altitud sobre el nivel del mar.

nach dem Sammeln mit ca. 4,4 l Alkohol und 1,1 l Chloroform versetzt und dadurch teilweise koaguliert war.

Nach Angaben von Herrn Dr. GOMEZ POMPA ist *Castilla elastica* die einzige in der genannten Gegend bekannte *Castilla*-Art. Figur 1 zeigt ein Herbarmuster, das leider steril ist und uns beschädigt erreichte.

Nach der Vorprüfung⁹⁾ enthielten die Samen (Probe a) keine Alkaloide, aber viel Cardenolide¹⁰⁾ mit stark positiver Xanthhydrol-Reaktion¹¹⁾. Beim Latex (Probe d) waren die Reaktionen auf Alkaloide¹²⁾ positiv, die KEDDE-¹⁰⁾ und die Xanthhydrol-Reaktion¹¹⁾ ebenfalls positiv, aber erheblich schwächer als bei den Samen.

a) *Extraktion der Samen und Vortrennung der Extrakte.* Zur Prüfung der Extraktionsmethode wurden als Vorversuch 103 g Samen gemahlen und mit Petroläther bei 20° entfettet. Von dem entfetteten Pulver wurde die Hälfte (39,5 g) nach früherer Vorschrift¹³⁾ zunächst bei 0° mit Wasser ausgezogen, der Rest mit Alkohol erschöpfend extrahiert und diese Auszüge nach Entfernung des Alkohols mit der ersten wässrigen Lösung fermentiert (= Versuch 1, mit Fermentierung)¹⁴⁾. Die zweite Hälfte wurde direkt mit Alkohol extrahiert (= Versuch 2, ohne Fermentierung). Die

Tabelle 1. Ausbeute an Rohextrakten aus Samen mit und ohne Fermentierung

Extrakte ¹⁵⁾	Mit Fermentierung Versuch 1 51,5 g Samen gaben		Ohne Fermentierung				Flecke im Papierchromatogramm In allen drei Versuchen gleich ¹⁶⁾
			Versuch 2 51,5 g Samen gaben		Versuch 3 1000 g Samen gaben		
	g	%	g	%	g	%	
Pe-Extr.	12,02	23,3	12,02	23,3	261,9	26,1	KEDDE-Reaktion negativ
Ae-Extr.	0,69	1,34	0,61	1,19	11,3	1,13	A, B
Chf-Extr.	0,611	1,19	0,715	1,39	11,7	1,17	A, B, C, D (E)
Chf-Alk-(2:1)-Extr.	0,193	0,38	0,656	1,27	9,45	0,95	F (F') (F'') (F''') ¹⁶⁾ , G, H, J, K

⁹⁾ Wir danken Frau Dr. E. ABISCH für die Ausführung dieser Vorversuche.

¹⁰⁾ Geprüft wurde mit der Reaktion nach D. L. KEDDE, Diss. Leyden 1946, ausgeführt nach I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, Biochem. J. 52, 643 (1952). Diese Reaktion ist bei allen Cardenoliden positiv.

¹¹⁾ V. ARREGUINE & P. E. PASQUALIS, Rev. Univ. Naç. Cordoba 32, 439 (1945); P. BELLET, Ann. pharmac. franç. 8, 471 (1950); M. PESEZ, *ibid.* 10, 104 (1952). Diese Reaktion ist zum Nachweis gebundener 2-Desoxyzucker sehr geeignet.

¹²⁾ Ausführung wie bei E. ABISCH & T. REICHSTEIN, Helv. 43, 1844 (1960), beschrieben.

¹³⁾ J. v. EUW, H. HESS, P. SPEISER & T. REICHSTEIN, Helv. 34, 1821 (1951).

¹⁴⁾ Die Fermente sind dabei offenbar nur unvollständig zur Wirkung gelangt. Vermutlich wäre ein viel weitgehender fermentativer Abbau erfolgt, wenn das Samenpulver direkt mit Wasser gewechselt worden wäre. Eventuell hätte man einen Zusatz von Chloroform machen können nach J. KRAUS & H. STEIN, Deutsch. Patentschr. Nr. 880195 (18. 6. 1953) von C. F. BOEHRINGER & SÖHNE GMBH.

¹⁵⁾ Abkürzungen für Lösungsmittel usw. vgl. Einleitung zum Exper. Teil.

¹⁶⁾ In Klammern schwache Flecke, erst nach präparativer Anreicherung sichtbar. Die Flecke F', F'' und F''' wurden nur im Versuch 3 und erst nach Behandlung des Chf-Alk-(2:1)-Extr. mit Strophanthobiase und chromatographischer Anreicherung sichtbar. Es ist unsicher, ob die entsprechenden Stoffe erst durch die Einwirkung dieses Ferments entstanden sind, oder ob sie nur durch die dadurch bewirkte präparative Anreicherung sichtbar wurden.

anschliessende Reinigung mit $\text{Pb}(\text{OH})_2$ und das fraktionierte Ausschütteln geschah nach früheren Angaben¹³). Über die Ausbeuten orientiert Tab. 1. Die verbliebene wässrige Phase enthielt keine merklichen Mengen an Cardenoliden mehr und wurde verworfen. Die Resultate dieser Vorversuche waren nicht ganz eindeutig. Die Ausbeuten an stark polaren Anteilen (Chf-Alk-(2:1)-Extr.) waren zwar mit Fermentierung merklich kleiner als ohne; die Ausbeuten an Ae- und Chf-Extrakt waren durch die Fermentierung aber nicht deutlich gestiegen¹⁴). Auch die Papierchromatogramme zeigten in beiden Versuchen dieselbe Zusammensetzung. Ein dritter Versuch mit 1 kg Samen wurde daher ohne Fermentierung ausgeführt. Ausbeute vgl. Tab. 1.

b) *Extraktion des Milchsafte*s. Die Extraktion des Milchsafte wurde nach der früher für *Antiaris*-Latex beschriebenen Methode¹⁷) in zwei Versuchen durchgeführt. Dabei wird die Hauptmenge des Kautschuks mit Alkohol ausgefällt. Bei der ersten Probe (Versuch Nr. 4 mit 1,12 kg ursprünglichem Latex) wurden die alkohollöslichen Anteile mit $\text{Pb}(\text{OH})_2$ gereinigt, wobei sich reichliche Mengen gelber Niederschläge bildeten. Um festzustellen, ob dabei event. grössere Verluste an Cardenoliden eintreten, wurde eine weitere Probe (Versuch Nr. 5 mit 0,56 kg ursprünglichem Latex) ohne Behandlung mit $\text{Pb}(\text{OH})_2$ weiter extrahiert. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, waren die Ausbeuten nahezu gleich.

Tabelle 2. Ausbeuten an Rohextrakten aus Latex mit und ohne $\text{Pb}(\text{OH})_2$ -Reinigung

Extrakte ¹⁵⁾	Mit $\text{Pb}(\text{OH})_2$ Versuch 4 1,12 kg Latex		Ohne $\text{Pb}(\text{OH})_2$ Versuch 5 0,56 kg Latex		KEDDE-Reaktion bzw. Flecke im Papierchromatogramm in beiden Proben gleich
	g	%	g	%	
Pe-Extr.	1,092	0,097	0,035	0,0062	negativ
Ae-Extr.	0,131	0,012	0,101	0,018	A, B, C, C', C''
Chf-Extr.	0,982	0,088	0,614	0,11	D
Chf-Alk-(2:1)-Extr.	0,635	0,057	0,395	0,07	negativ
Chf-Alk-(3:2)-Extr.	0,193	0,017	nicht gemacht		—

c) *Vorprüfungen und papierchromatographische Kontrolle*. Der Pe-Extrakt der Samen stellte eine kristalline Masse dar. Die Reaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD¹⁸) gab eine Rotfärbung; die KEDDE-Reaktion war negativ. Das Material wurde nicht weiter untersucht.

In den drei weiteren Extrakten der Samen liessen sich, teilweise erst nach präparativer Anreicherung, in den Systemen von Fig. 2–6 mit KEDDE-Reagens insgesamt 10 Stoffe nachweisen¹⁶), die wir in der Reihenfolge zunehmender Polarität mit den Buchstaben A–K bezeichnen. Für die zugehörigen Flecke in den Papierchromatogrammen benützen wir dieselben Buchstaben. Die Verteilung dieser 10 Stoffe in den 3 Extrakten ist aus Tab. 1 ersichtlich. Nach Behandlung des Chf-Alk-(2:1)-Extrakts mit Strophanthobiase (siehe unten) wurden noch drei weitere Flecke (F', F'' und F''') sichtbar. Es ist aber unsicher, ob die entsprechenden Stoffe bereits im ursprünglichen Chf-Alk-(2:1)-Extrakt anwesend waren, oder ob sie erst bei der mittels dieses Ferments erfolgten präparativen Anreicherung entstanden sind.

¹⁷⁾ F. DOLDER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 38, 1364 (1955), und frühere Lit. daselbst.

¹⁸⁾ Ausführungsform nach A. STOLL, E. SUTER, W. KREIS, B. B. BUSSEMAKER & A. HOFMANN, *Helv.* 16, 703 (1933).

Der Latex enthielt nicht nur mengenmässig viel weniger Gesamtcardenolide, sondern auch weniger zahlreiche Stoffe. Im Ae-Extrakt aus Latex waren 5 Stoffe (A, B, C, C' und C'') nachweisbar, von denen C' und C'' in den Samen nicht anwesend waren.

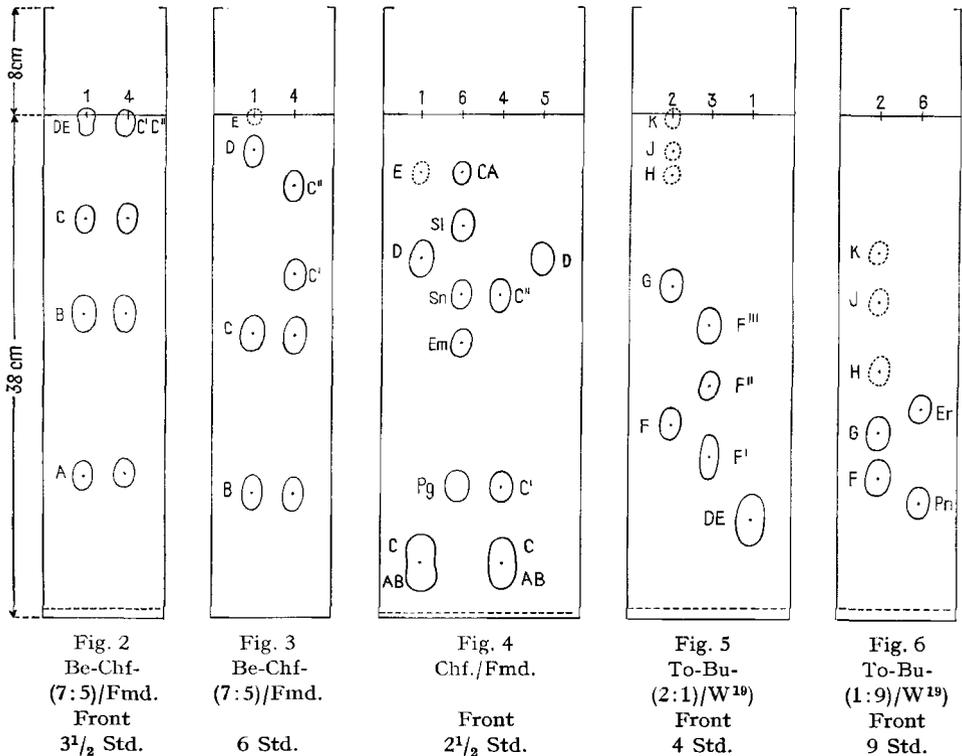


Fig. 2-6 sind Beispiele von Papierchromatogrammen^{19) 20)}, schematisiert, aber massgetreu Ausführung absteigend, nach früheren Angaben²¹⁾

1 = 0,15 mg Chf-Extrakt aus Versuch 1 (Tab. 1).

2 = 0,15 mg Chf-Alk-(2:1)-Extrakt aus Versuch 3 (Tab. 1).

3 = 0,05 mg Aldehydfreie Anteile aus ML der Fr. 18-37 (Tab. 7).

4 = 0,15 mg Ae-Extrakt aus Latex.

5 = 0,15 mg Chf-Extrakt aus Latex.

6 = Vergleichssubstanzen, je 0,03 mg: CA = Corchorosid A, Em = Emicymarin, Er = Erysimosid²²⁾, Pg = Periplogenin, Pn = Periplocin²³⁾, Sn = Strophanthidin, Sl = Strophanthidol.

¹⁹⁾ Beladung mit Wasser nach M. T. KRAUSS, HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, J. Chromatogr. 3, 63 (1960), jedoch nur mit 35% des Papiergewichtes.

²⁰⁾ Abkürzungen für Lösungsmittel usw. vgl. Einleitung zum Exper. Teil.

²¹⁾ O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. 34, 108 (1951). Imprägnierung mit 50% des Papiergewichtes an Fmd, Durchziehen durch An-Fmd-(4:1), vgl. H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. 36, 357 (1953); E. SCHENKER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, Helv. 37, 680 (1954); F. KAISER, Chem. Ber. 88, 556 (1955).

²²⁾ V. A. MASLENNIKOWA, F. S. CHRISTULAS & N. K. ABUBAKIROW, Doklady Akad. Nauk. SSSR 124, 822 (1959); Chem. Abstr. 53, 16204^e (1959). Es wurde das von Z. KOWALEWSKI, O. SCHINDLER, HERB. JÄGER & T. REICHSTEIN, Helv. 43, 1280 (1960), beschriebene Präparat verwendet.

²³⁾ A. STOLL & J. RENZ, Helv. 22, 1193 (1939).

Im Chf-Extrakt war nur D zu erkennen. Auffallenderweise waren praktisch keine stärker polaren Cardenolide vorhanden.

d) *Ergebnisse.* Bei den Extrakten aus den Samen liessen sich durch die weiter unten beschriebenen Trennungen von den 13 papierchromatographisch nachgewiesenen Stoffen 9 (A, B, C, D, E, F, F', F'', F''' und G) in reinen Kristallen isolieren. Von diesen konnten A, B, C, D, F und G eindeutig mit bekannten Cardenolid-Glykosiden identifiziert werden (vgl. Tab. 3). Die Stoffe F', F'' und F''' wurden nur in Spuren erhalten. F' ist vermutlich identisch mit Helveticosol. Das Material reichte aber für

Tabelle 3. Die isolierten oder papierchromatographisch nachgewiesenen Stoffe

Substanz	Identifizierung			Smp. darunter [α] _D		KEDDE-Reaktion ¹⁶⁾ Xanthydrol-R. 11) Zuckerprüfung*) ²⁴⁾			Weitere Bestimmungen oder Bemerkungen
	mit	Durch präp. Isolierung	Nur nach Pch	hier gefunden	nach Literatur	+	+	+	
A	Periplocymarin	+		203–207° + 29,0 Me	207–209° + 28,8 Me ²⁵⁾	+	+		
B	Cymarin	+		146–148° + 35,9 Me	138–141° + 39,2 Me ²⁶⁾	+	+		Hydrolyse
C	Cymarol	+		218–235° + 25,1 80-proz. Me	210–238° + 22,1 80-proz. Me ²⁷⁾	+	+		
C'	Periplogenin		+	–	185–190° + 29,8 Me ²⁸⁾	+			
C''	Strophanthidin	+		130–135° –	136–138° + 40,8 Alk ²⁹⁾	+			
D	Helveticosid	+		155–158° + 29,0 Me	150–155° + 31,1 Me ³⁰⁾	+	+		
E	Corchorosid A		+	–	163–168° + 18,8 Me ³¹⁾	+	+		
F	Desglucocheirotoxin	+		186–191° – 1,9 Me	188–189° + 1,3 Me ³²⁾	+	–	+	Analyse, IR.-Spektrum, O-Acetyl-Derivat, Hydrolyse
F'	Helveticosol (?)		+	147–152° –	148–152° – ³³⁾	+	+		Hydrolyse
F''	ev. neu			165–171° –	– –	+	+		Hydrolyse
F'''	cv. neu			170–179° –	– –	+	±		Hydrolyseversuch
G	k-Strophanthin- β	+		207–212° + 24,3 Me	195° + 31,8 Me ³⁴⁾	+	+		Fermentativer Abbau
H	Cheirotoxin		+	– –	210–211° – 17,2 Me ³²⁾				
J	–			–	–				nicht identifiziert
K	k-Strophanthosid		+	– –	199–200° + 13,8 Me ^{34b)}				

*) Anmerkungen siehe S. 910.

eine eindeutige Identifizierung nicht aus. Bei F'' und F''' könnte es sich um neue Stoffe handeln (siehe unten). Von den vier nicht isolierten Stoffen (E, H, J und K) konnte für drei (E, H und K) auf papierchromatographischem Wege die Identität mit Corchorosid A, Cheirotoxin und k-Strophanthosid sehr wahrscheinlich gemacht werden (Tab. 3). J ist möglicherweise ein neuer Stoff.

Bei den Extrakten aus Latex wurde nur C'' präparativ isoliert. Bei den 5 anderen Stoffen (A, B, C, C' und D) begnügten wir uns mit der papierchromatographischen Identifizierung.

c) *Ausführung der Trennungen. – Trennung des Äther-Extrakts aus Samen.* Bisher wurde nur das Material aus Versuch 1 (mit Fermentierung) untersucht; es enthielt, wie das Material der anderen zwei Versuche, nach Papierchromatogramm nur die Stoffe A und B. Nach Chromatographie an Al_2O_3 liess sich B in einheitlichen Kristallen fassen. Ferner wurden angereicherte Gemische von A + B erhalten. Letztere wurden mit Reagens T von GIRARD & SANDULESCO³⁵) behandelt, wodurch B eliminiert wurde. Aus dem verbliebenen Material liess sich reines A in Kristallen isolieren. Die mit Reagens T in Reaktion getretenen Anteile gaben nach Spaltung mit Säure³⁶) reines Strophanthidin, das aus B (Cymarlin) stammte.

Trennung des Chloroform-Extrakts aus Samen. Es wurde das Material aus den Versuchen 1 und 2 getrennt. Es enthielt nach Papierchromatogramm dieselben Stoffe (A, B, C, D und (E)) und gab bei der Trennung gleiche Resultate. Nach Chromatographie an Al_2O_3 liessen sich B und D in reinen Kristallen fassen. Die Mutterlaugen von D enthielten kleine Mengen der Subst. E; diese zeigte in den Systemen von Fig. 4 und 5 dieselbe Laufstrecke wie Corchorosid A. Es wurden keine Versuche unternommen, diesen Stoff präparativ zu fassen. Bei der Chromatographie wurden noch Gemische von B, C und wenig D erhalten. Mit Reagens T von GIRARD und SANDULESCO liessen sich daraus B und D entfernen, worauf C in reinen Kristallen erhalten wurde.

²⁴) P. R. O. BALLY, K. MOHR & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 1740 (1951). Nur ausgeführt, wenn Xanthidrol-Reaktion negativ war.

²⁵) A. STOLL & J. RENZ, *Helv.* 22, 1193 (1939); J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 33, 544 (1950), und frühere Lit. daselbst.

²⁶) J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 31, 883 (1948), und frühere Literatur daselbst.

²⁷) W. BLOME, A. KATZ & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.* 21, 325 (1946).

²⁸) W. A. JACOBS & A. HOFFMANN, *J. biol. Chemistry* 67, 609 (1926); P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 30, 2143 (1947), und frühere Literatur daselbst.

²⁹) W. A. JACOBS & M. HEIDELBERGER, *J. biol. Chemistry* 54, 253 (1922); T. REICHSTEIN & H. ROSENMUND, *Pharmac. Acta Helv.* 15, 150 (1940).

³⁰) W. NAGATA, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Festschr. Prof. A. STOLL*, S. 715 (Basel 1957); *Helv.* 40, 41 (1957).

³¹) M. FRÈREJACQUE & M. DURGEAT, *C. r. hebdom. Séances Acad. Sci.* 238, 507 (1954); W. KREIS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 40, 593 (1957).

³²) J. A. MOORE, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 755 (1954), und frühere Lit. daselbst.

³³) F. KAISER, E. HAACK, M. GUBE, U. DÖLBERG & H. SPINGLER, *Naturwiss.* 46, 670 (1959); R. ZELNIK, J. v. EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 43, 593 (1960).

³⁴) a) W. A. JACOBS, *J. biol. Chemistry* 57, 569 (1923). – b) A. STOLL, J. RENZ & W. KREIS, *Helv.* 20, 1484 (1937), und frühere Lit. daselbst.

³⁵) A. GIRARD & G. SANDULESCO, *Helv.* 19, 1095 (1936).

³⁶) E. LEDERER & G. NACHMIAS, *Bull. Soc. chim. France* 1949, 400; O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 521 (1951).

Trennung des Chf-Alk-(2:1)-Extrakts aus Samen. Im Versuch 3 wurden die einzelnen Ausschüttelungen separat eingedampft. Die erste wog 6,0 g und enthielt die Hauptmenge der Cardenolide. Bisher wurde nur dieser Teil getrennt. Direkte Kristallisation aus Wasser gab G in reinen Kristallen sowie Kristallgemische, die viel G mit wenig F, H, J und K enthielten. Letztere wurden nicht getrennt. Die Hauptmenge F, H, J und K verblieb in dem amorphen Mutterlaugenrückstand. Die Hauptmenge desselben (2,5 g, entspr. 950 g Samen) wurde mit Strophanthobiase fermentativ abgebaut, wobei die in Tab. 4 angegebenen Ausbeuten (B-Extrakte) erhalten wurden.

Tabelle 4. *Ausbeute an rohen Extrakten nach fermentativem Abbau von 2,5 g amorphem Mutterlaugenrückstand des Chf-Alk-(2:1)-Extrakts*

Extrakt	Menge in mg	Flecke im Pch
Chf-Extr. B	1657	B
Chf-Alk-(4:1)-Extr. B .	751	F (F') (F'') (F''')
Chf-Alk-(2:1)-Extr. B .	79	(F) G (H) (J)
Total	2487	

Daraus geht hervor, dass von den im ursprünglichen Chf-Alk-(2:1)-Extr. enthaltenen Stoffen die Substanz K vollständig, und die Substanzen G, H und J weitgehend vom Ferment abgebaut worden waren.

Der Chf-Extr. B gab bei direkter Kristallisation 661 mg reine Subst. B (Cymarine).

Der Chf-Alk-(4:1)-Extr. B wurde an SiO_2 chromatographiert, worauf sich F in reinen Kristallen isolieren liess. In der Mutterlauge waren jetzt die Begleitstoffe (F', F'' und F''') papierchromatographisch nachweisbar. Das Gemisch wurde mit Reagens T von GIRARD & SANDULESCO³⁵⁾ behandelt, wobei F entfernt wurde. Das Gemisch von F', F'' und F''' wurde hierauf durch präparative Papierchromatographie³⁷⁾ getrennt, worauf sich kleine Mengen aller drei Stoffe in Kristallen isolieren liessen.

Trennung der Extrakte aus Milchsaft. Der Ätherextrakt aus Versuch 4 (1,12 kg Latex) wurde an Al_2O_3 chromatographiert, worauf sich C'' in Kristallen isolieren liess. A, B, C und C' wurden nur in Mischfraktionen angereichert und papierchromatographisch identifiziert. Subst. D liess sich aus dem Chloroform-Extrakt von Versuch 5 (0,56 kg Latex) durch Chromatographie stark anreichern. Sie konnte dabei aber nicht kristallisiert werden und wurde lediglich papierchromatographisch identifiziert.

f) *Besprechung der isolierten und nachgewiesenen Stoffe. – Cardenolide aus Samen:* Die Identifizierung von A, B, C, D, F und G erfolgte nach Smp., Drehung, Mischprobe und direktem Vergleich im Papierchromatogramm, sowie nach Farbreaktion mit 84-proz. H_2SO_4 . Bei F wurden ausserdem nach Hydrolyse die Komponenten papierchromatographisch mit authentischen Proben verglichen. Ferner wurde aus F das krist. Tri-O-acetyl-Derivat bereitet. E, H und K wurden nur papierchromatographisch identifiziert. Auf eine präparative Isolierung dieser drei Stoffe wurde verzichtet, weil E nur in Spuren anwesend war und die Identität von H und K nach Isolierung der Desgluco-Verbindungen F und G, bzw. B fast selbstverständlich war. Hier werden nur noch F', F'' und F''' besonders besprochen. Sie zeigten mit 84-proz. H_2SO_4 die in Tab. 5 genannten Färbungen. Danach ist zu vermuten, dass sie als Genin alle Stro-

³⁷⁾ E. v. ARX & R. NEHER, Helv. 39, 1664 (1956).

phanthidol enthalten. F' gab positive Xanthhydrolreaktion. Milde saure Hydrolyse im Mikromaßstab³⁸⁾ lieferte ein Genin mit einer Laufstrecke wie von Strophanthidol und einen Zucker mit Laufstrecke wie von Digitoxose³⁹⁾. Demnach sollte F' mit Helveticosol identisch sein. Der direkte Vergleich im Papierchromatogramm war nicht völlig eindeutig⁴²⁾, ein signifikanter Unterschied war aber nicht feststellbar.

Tabelle 5. Färbungen mit 84-proz. H₂SO₄

Zeit in Min.	Subst. F'	Subst. F''	Subst. F'''	Helveticosol	Convallatoxol	Convallatoxin
0-5'	rotbraun	rotbraun	rotbraun	rotbraun	rotbraun	zitronengelb
10'	"	"	"	"	"	"
30'	grau	grau	fahl grau	fahl rötlich braun	fahl rotbraun	"
60'	"	"	fahl grau mit Grünstich	" " "	" "	"
120'	"	"	" " "	" " "	" "	mit Grünstich grün

F'' zeigte im System von Fig. 5 dieselbe Laufstrecke wie Convallatoxin, was ein Zufall sein dürfte, denn F'' hatte mit Reagens T nicht reagiert und auch die Farbreaktionen waren völlig verschieden (Tab. 5). Dieselbe Laufstrecke zeigte auch Desglucocheirotaxol (aus Desglucocheirotaxin mit NaBH₄ bereitet). Es ist möglich, dass das rohe F''-Präparat (aber nicht die Kristalle) auch dieses Glykosid enthalten hatte. F'' zeigte positive Xanthhydrolreaktion. Die milde saure Hydrolyse musste mit Kristall-Mutterlaugen durchgeführt werden und lieferte auch hier ein Genin mit der Laufstrecke von Strophanthidol. Der Zucker gab zwei deutliche und zwei schwache Flecke. Die ersteren entsprachen 2-Desoxy-D-glucose und Digitoxose. Das verwendete Präparat von F'' war daher nicht ganz einheitlich. Wir glauben, dass es zur Hauptsache das 2-Desoxy-D-glucosid des Strophanthidols enthalten hatte⁴³⁾.

F''' zeigte im Papierchromatogramm (System von Fig. 5) dieselbe Laufstrecke wie Convallatoxol⁴⁵⁾ und es wäre nicht ausgeschlossen, dass es mit diesem identisch ist, obwohl Rhamnose bisher in *Castilla elastica* nicht beobachtet wurde. Auch F''' gab eine positive Xanthhydrolreaktion; es scheint dies aber auf Spuren von Verunreinigungen oder auf einer Täuschung zu beruhen. Unter den Bedingungen der milden sauren Hydrolyse³⁸⁾ blieb F''' im wesentlichen unverändert. – Ein Versuch zur Spal-

³⁸⁾ Vgl. HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. 42, 977 (1959).

³⁹⁾ Im System To-Bu-(1:9)/W (Front⁴⁰⁾ entwickelt mit Vanillin-Perchlorsäure⁴¹⁾).

⁴⁰⁾ O. RENKONEN & O. SCHINDLER, Helv. 39, 1490 (1956).

⁴¹⁾ A. P. MACLENNAN, H. M. RANDALL & D. W. SMITH, Anal. Chem. 31, 2020 (1959).

⁴²⁾ F' gab im System von Fig. 5 einen etwas langgezogenen Fleck. Die Laufstrecke im Vergleich zu Helveticosol betrug 0,94. Für eine Wiederholung war kein Material mehr vorhanden.

⁴³⁾ 2-Desoxy-D-glucose ist kürzlich als Bestandteil des Perofskosids in *Erysimum perofskianum* aufgefunden worden⁴⁴⁾. Im System To-Bu-(1:9)/W (Front) zeigt dieser Zucker dieselbe Laufstrecke wie Rhamnose und Gulomethylose. Möglicherweise waren kleine Mengen von Perofskosid auch in *Castilla elastica* anwesend. In einem Vorversuch wurde nach fermentativem Abbau einer Probe des Chf-Alk-(2:1)-Extrakts ein Rohpräparat von F gewonnen. Dieses zeigte nach milder saurer Hydrolyse im Pch die Flecke von Strophanthidin und 2-Desoxy-D-glucose. Perofskosid zeigt im Pch eine sehr ähnliche Laufstrecke wie F. Beim Hauptversuch muss es, falls es vorhanden war, zusammen mit F durch das Reagens T entfernt worden sein.

⁴⁴⁾ Z. KOWALEWSKI, O. SCHINDLER, HERB. JÄGER & T. REICHSTEIN, Helv. 43, 1280 (1960).

tung unter energischen Bedingungen (mit KILIANI-Mischung) musste mit Kristallmutterlaugen durchgeführt werden und gab kein eindeutiges Resultat.

Cardenolide aus Milchsafft. Der Milchsafft enthielt nur relativ kleine Mengen von Cardenoliden. Präparativ isoliert wurde nur C'' (= Strophanthidin). Die Stoffe A, B, C und D waren nach Papierchromatogramm identisch mit denselben Bestandteilen der Samen, daher wurde auf Versuche zur präparativen Isolierung der kleinen Mengen verzichtet. C' liess sich papierchromatographisch mit Periplogenin identifizieren.

Tabelle 6. Übersicht der erhaltenen Ausbeuten und Schätzung der in den Samen wirklich vorhandenen Menge

Substanz	Isoliert aus 51,5 g Samen ⁴⁶⁾		Schätzung des wahren Gehalts ⁴⁷⁾			
	mg	%	In 51,5 g Samen		In 1,12 kg Milchsafft	
			mg	%	mg	%
A = Periplocyamarin	65	0,126	180	0,35	20	0,001
B = Cymarol	272 ⁴⁸⁾	0,53	450	0,87	20	0,001
C = Cymarol	19,9	0,038	40	0,078	5	0,0003
D = Helveticosid	7,6	0,015	30	0,058	5	0,0003
E = Corchorosid A	—	—	10	0,02	—	—
F = Desglucocheirotoxin	18,5	0,036	30	0,058	—	—
F' = Helveticosol	0,15	0,0003	1	0,002	—	—
F'' = Subst. F''	0,1	0,0002	1	0,002	—	—
F''' = Subst. F'''	0,08	0,00016	0,5	0,001	—	—
G = k-Strophanthin- β	118	0,23	230	0,45	—	—
H = Cheirotoxin	—	—	ca. 3	0,006	—	—
J = Subst. J	—	—	ca. 5	0,01	—	—
K = k-Strophanthosid	—	—	ca. 10	0,02	—	—
C' = Periplogenin	—	—	—	—	5	0,0003
C'' = Strophanthidin	—	—	—	—	20	0,001

g) *Diskussion der Resultate.* Von der Familie der Moraceen wurden bisher zwei Vertreter, die Cardenolidglykoside enthalten, näher untersucht. Es sind dies *Antiaris toxicaria*¹⁷⁾ sowie *Streblus asper*⁴⁹⁾. Erstere enthält im Milchsafft zahlreiche Cardenolide, bei denen die Antiarine überwiegen; ihr gemeinsames Genin (Antiarigenin) ist noch nicht völlig aufgeklärt. *Streblus asper* enthält in der Rinde ein Gemisch von Glykosiden, die sich vom Digitoxigenin, Periplogenin und Strophanthidin ableiten, und die vor allem mit 2,3-Di-O-methyl-D-glucose und 2,3-Di-O-methyl-D-fucose verknüpft sind. – Die Samen von *Castilla elastica* unterscheiden sich wesentlich von denjenigen der zwei genannten anderen Vertreter der Moraceen. Sie enthalten als Hauptglykoside Cymarol und k-Strophanthin- β , also dieselben Stoffe wie *Strophanthus kombé*, und auch die Begleitstoffe sind teilweise dieselben wie in den Samen von

⁴⁵⁾ A. HUNGER & T. REICHSTEIN, Chem. Ber. 85, 635 (1952).

⁴⁶⁾ Wenn zur Isolierung des Stoffes weniger oder mehr Samen verwendet wurden, ist die Ausbeute auf 51,5 g umgerechnet.

⁴⁷⁾ Rohe Schätzung auf Grund der erhaltenen Ausbeuten, der Kristallisierbarkeit, sowie der Stärke der Flecke im Pch. Ein Teil der isolierten F-Kristalle könnte bei der Aufarbeitung aus H entstanden sein.

⁴⁸⁾ Das bei der Trennung mit Reagens T erhaltene Strophanthidin ist hier auf Cymarol umgerechnet mitgezählt.

⁴⁹⁾ Diss. M. P. KHARE, Basel 1959.

Strophanthus kombé. Corchorosid A und Desglucocheirotxin wurden in *S. kombé* jedoch bisher nicht angetroffen. Der Milchsafte von *Castilla elastica* war viel ärmer als die Samen. Von den Glykosiden enthielt er nur die ersten vier, dafür aber noch etwas der zugehörigen freien Genine (Periplogenin und Strophanthidin)^{49a}).

Wir danken dem SCHWEIZ. NATIONALFONDS für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze in benützter Ausführungsart bis 200° ca. $\pm 2^\circ$, darüber ca. $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Drehungsbestimmung wurden 1 Std. bei 0,01 Torr und 70° getrocknet. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chf-Ae-(1:3) oder anderem Lösungsmittel, wo erwähnt, Waschen mit 2N HCl, 2N Na₂CO₃ und W, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum. Adsorptionschromatographie nach der Durchlaufmethode⁵⁰) an Al₂O₃ (WOELM, neutral) oder SiO₂ (zur Chromatographie, Korngrösse 0,15–0,3 mm).

Es werden die folgenden Abkürzungen benützt: AcOH = Eisessig, (Ac)₂O = Acetanhydrid, Ae = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Be = Benzol, Bu = n-Butanol, Chf = Chloroform, Fmd = Formamid, «Gemisch» = Chf-Me-Äthylacetat-(1:1:1), Me = Methanol, Pe = Petroläther, Py = Pyridin, To = Toluol, W = Wasser; ferner ML = eingedampfte Mutterlauge, Pch = Papierchromatogramm und Papierchromatographie. Verhältniszahlen bedeuten immer das Verhältnis der Volumina.

Milde Hydrolyse im Mikromaßstab. 3 mg Glykosid (od. angegebene Menge) wurden in 0,5 ml Me gelöst, mit 0,5 ml 0,1N wässriger H₂SO₄ versetzt und 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde im Vakuum bei 20° auf 0,4 ml eingengt, mit W auf 1 ml verdünnt und 30 Min. auf 65° erwärmt. Nach Erkalten wurde 4mal mit je 0,8 ml Chf ausgeschüttelt. Die mit W, Na₂CO₃ und W gewaschenen Auszüge wurden über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Rückstand = rohes Genin diente zur Prüfung im Pch. Die saure wässrige Phase wurde mit frisch aus Ba(OH)₂ mit CO₂ gefälltem und gut mit W gewaschenem BaCO₃ oder mit Anionenaustauscher (Amberlite IR 4B), der vorher mit 7-proz. NaOH, dann gründlich mit W gewaschen worden war, neutralisiert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (roher Zucker) diente zur Pch.

A. Untersuchung der Samen. - Die eiförmigen, hellgelben Samen zeigten im Durchschnitt folgende Masse: 9–10 \times 8–8,5 mm, 0,264 g mit Schale, resp. 0,246 g ohne Schale. Die Samenschale liess sich leicht ablösen und schmeckte nicht bitter. Zur Extraktion dienten nur die sehr stark bitteren Kerne.

Extraktionen. Diese erfolgten nach früherer Vorschrift¹³), Ausbeute vgl. Tab. 1. Bei Versuch 3 wurden die Ausschüttelungen mit Chf-Alk-(2:1) einzeln eingedampft und gewogen. Es resultierten: 1. Ausschüttelung = 6,0 g, 2.–6. Ausschüttelung = 3,45 g, total 9,45 g.

Trennung des Ae-Extr. aus Versuch 1 (mit Fermentierung). 690 mg Ae-Extr. aus Versuch 1 (entspr. 51,5 g Samen) gaben aus Me-Ae 560 mg farblose Spiesse, Smp. 140–148°, nach Pch A + B. Die ML (125 mg) zeigte im Pch auch nur A und B und wurde nicht getrennt.

553 mg Kristallgemisch wurden an 17 g Al₂O₃ chromatographiert.

Die Fr. 5–7 (168 mg, eluiert mit Be-Chf-(1:1)) gaben aus Me-Ae 156 mg Kristallgemisch, Smp. 140–144°/203–207°, nach Pch A + B. Wurde mit Reagens T getrennt (siehe unten).

Die Fr. 8–20 (205 mg, eluiert mit Be-Chf-(1:1)) gaben aus Me-Ae 119 mg B-Kristalle, Smp. 145–149°, die noch wenig A enthielten (nicht getrennt).

Die Fr. 21–27 (130,9 mg, eluiert mit Be-Chf-(3:7) und reinem Chf) gaben aus Me-Ae 67 mg reines B, Smp. 146–148°.

Die 156 mg Kristallgemisch aus Fr. 5–7 wurden mit 75 mg reinstem Reagens T³⁵) in 1,5 ml Me und 2 ml abs. Alk heiss gelöst, nach Erkalten mit 0,15 ml AcOH versetzt und 17 Std. bei 22° stehengelassen. Die Aufarbeitung mit Chf-Ae-(1:3) nach früherer Vorschrift³⁶) gab 96 mg alde-

^{49a}) *Nachtrag bei der Korr.* Nach Abschluss der Korrektur wird uns die Publikation von G. R. ADAMS & S. WILKINSON im J. of Pharmacy & Pharmacol. 13, 279 (1961) bekannt. Diese Autoren isolierten Cymarin und Periplocymarin aus den Samen von *Castilla elastica* CERV.

⁵⁰) T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Discuss. Faraday Soc. 7, 305 (1948).

hydrefreie Anteile und 22,7 mg regenerierte Aldehyde. Die ersteren lieferten aus Me-Ae 65 mg reines A in farblosen Nadeln, Smp. 203–207°. Die regenerierten Aldehyde lieferten aus An-Ae 11,7 mg krist. Strophanthidin, Smp. 144–148° (Pch, Mischprobe und Farbreaktionen).

Wir schätzen den Gehalt des Ae-Extr. auf ca. 120 mg A und 300 mg B. Der Ae-Extr. aus Versuch 3 (1 kg Samen ohne Fermentierung) gab aus Me-Ae 8,712 g Kristalle (A + B), die nicht getrennt wurden.

Trennung des Chf-Extrakts. 611 mg Chf-Extr. aus Versuch 1 (51,5 g Samen mit Fermentierung) wurden an 17,5 g Al₂O₃ chromatographiert, vgl. Tab. 7.

Tabelle 7. *Chromatographie von 611 mg Chf-Extr. aus Versuch 1 (51,5 g Samen)*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel 55 ml pro Fr.	Eindampfrückstand					Weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle			
		Menge in mg	Flecke im Pch	Menge in mg	Flecke im Pch	Smp.	
1–4	Be-Chf-(75:25)	4,4	—	—			verworfen
5–13	„ „ „ „	197,3	A, B	160	A, B	142–145°	nicht getrennt
14–17	„ „ „ -(30:70)	74,7	B	42	B	136–142°	Endprodukt
18–20	„ „ „ „	16,2	B (C)	14	B (C)	139–143°	Endprodukt
21–24	„ „ „ „	13,7	B, C	—	—	—	Trennung mit Reagens T
25	Chf	17	(B) C	—	—	—	
26–31	„	51,1	C(B) (D)	—	—	—	
32	Chf-Me-(98:2)	32,2	C, D	—			nicht getrennt
33–36	„ „ „ „	48,2	D (E)	} 7,6	D	154–158°	Endprodukt
37–38	„ „ „ -(96:4)	8,2	„ „				
39–40	„ „ „ -(95:5)	19,0	„ „				
41–42	„ „ „ -(90:10)	8,9	„ „	—			nicht getrennt
43–45	„ „ „ -(50:50)	6	—	—			„ „
46–47	«Gemisch» + 2% AcOH	4,8	—	—			„ „

Die Fr. 21–31 wurden vereinigt (81,8 mg). Von dem Gemisch wurden 65 mg (entspr. 41 g Samen) mit Reagens T wie oben getrennt. Die aldehydfreien Anteile (22,5 mg) gaben aus An-Ae 19,9 mg reine Subst. C in farblosen Nadeln, Smp. 218–235°.

Die regenerierten Aldehyde (24,9 mg) gaben aus Me-Ae 13,9 mg Strophanthidin in farblosen Nadeln.

In diesem Chf-Extrakt waren nach Tab. 7 schätzungsweise total ca. 60 mg A, 250 mg B, 30 mg C, 30 mg D und 8 mg E enthalten.

Der Chf-Extr. aus Versuch 2 (51,1 g Samen, ohne Fermentierung) wurde ebenfalls chromatographiert und gab ganz ähnliche Ausbeuten, u. a. 204 mg B in reinen Kristallen.

Der Chf-Extr. aus Versuch 3 (1000 g Samen, ohne Fermentierung) gab aus Me-Ae 4,955 g rohe Kristalle, Smp. 140–152°, die nicht getrennt wurden.

Untersuchung des Chf-Alk-(2:1)-Extrakts. – Vorversuch. 60 mg Chf-Alk-(2:1)-Extr. aus Versuch 2 (51,5 g Samen, ohne Fermentierung) wurden mit der Lösung von 100 mg Strophanthobiase⁵¹⁾ in 8 ml W, 1 Tropfen 50-proz. AcOH und 0,5 ml To 13 Tage bei 37° unter CO₂ stehen gelassen. Hierauf wurde mit 100 ml Alk versetzt, auf 40° erwärmt, durch ein mit gewaschenem Kieselgur (Hyflo Super Cel) gedichtetes Filter genutscht und mit Alk nachgewaschen. Dann wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 10 ml W gelöst, 5mal mit je 15 ml Chf und 5mal mit je 15 ml Chf-Alk-(2:1) ausgeschüttelt. Die im Gegenstrom mit W, Sodalösung und W

⁵¹⁾ A. STOLL & J. RENZ, *Enzymologia* 7, 362 (1939), und frühere Lit. daselbst. Wir benützten ein Präparat aus käuflichen Samen von *Strophanthus kombé*, vgl. J. SCHMUTZ, *Pharmac. Acta Helv.* 22, 373 (1947).

gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben 32,7 mg Chf-Extr. B (im Pch nur B) und 20,8 mg Chf-Alk-(2:1)-Extr. B (im Pch nur F). 19,1 mg des letzteren wurden an 1 g SiO_2 chromatographiert.

Die mit Chf-Me-(95:5) eluierten Anteile (4,3 mg) zeigten im Pch nur den F-Fleck⁵²), gaben aber schwach positive Xanthydroly-Reaktion. 4 mg davon wurden mild hydrolysiert. Das rohe Genin (3 mg) zeigte im Pch (Chf/Fmd wie Fig. 4) neben einem stationären Fleck (F ?) nur den Fleck des Strophanthidins. Der Zucker zeigte im Pch (Bu/W; Front, Entwicklung mit Aniliniumhydrogen-phthalat) drei Flecke entsprechend Cymarose, Digitoxose und 2-Desoxy-D-glucose.

Hauptversuch. 5,7 g Chf-Alk-(2:1)-Extr. (erster Auszug, entspr. 950 g Samen) wurden in 50 ml W bei 50° gelöst und 1 Std. bei 22° stehengelassen. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abgenutscht, mit kaltem W gewaschen und im Vakuum getrocknet. 1,23 g, Smp. 207–212°, nach Pch reines G. Die Mutterlauge gab nach weiterem Stehen noch 979 mg Kristalle, Smp. 175–190°, nach Pch G (F) (H) (J) (K). Die verbliebene Mutterlauge (zeigte im Pch F, G (H) (J) (K)) wurde im Vakuum auf 15 ml eingengt. Die bei +2° fast klare Lösung schied beim Erwärmen auf 25° Kristalle ab. Abgenutscht, mit W gewaschen, resultierten 616 mg farblose Spiesse, Smp. 170–175°, nach Pch G (F).

Die verbliebene Mutterlauge gab beim Eindampfen noch 2,5 g amorphen Rückstand. Er wurde mit 5 g Strophanthobiase in 400 ml W nach Zusatz von etwas AcOH und To unter CO_2 14 Tage bei 37° fermentiert. Nach Ausfällen des Ferments und Einengen im Vakuum wurde aus der 80 ml betragenden wässrigen Lösung je 5mal mit je 150 ml Chf, Chf-Alk-(4:1) und Chf-Alk-(2:1) ausgeschüttelt. Als B-Extrakt bezeichnet. Ausbeute vgl. Tab. 4. Die 1,657 g Chf-Extr. B gaben aus Me-Ae 661 mg farblose Spiesse, Smp. 148–150°, nach Pch reines B.

740 mg Chf-Alk-(4:1)-Extr. B (entspr. 935 g Samen) wurden an 37 g SiO_2 grob chromatographiert. Die mit Chf und Chf-Me-Gemischen bis 4% Me-Gehalt eluierten Anteile (52 mg) gaben mit KEDDE-Reagens keine Färbung (verworfen). Mit Chf-Me-(95:5) liessen sich 635 mg eluieren. Dieses Material wurde nochmals sorgfältig an 31 g SiO_2 chromatographiert, vgl. Tab. 8.

Tabelle 8. *Chromatographie von 635 mg vorgereinigtem Chf-Alk-(4:1)-Extr. B an 31 g SiO_2*

Fraktions Nr.	Lösungsmittel je 60 ml pro Fr.	Eindampfrückstand					Weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle			
		Menge in mg	Flecke im Pch	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pch	
1–2	Chf-Me-(98:2)	5,8	—	—	—	—	verworfen
3–8	„ „ -(96:4)	14,5	—	—	—	—	„
9–10	„ „ -(95:5)	9,1	—	—	—	—	„
11–14	„ „ „ „	49,2	F (F')	13,5	179–185°	F (F')	Endprodukt
15–17	„ „ „ „	51,5	F	41,8	184–187°	F	„
18–37	„ „ „ „	297,5	F	225,3	186–191°	F	ML mit Reagens T
38–39	„ „ „ „	16,1		—	—	—	
40–43	„ „ -(90:10)	71,6	F (F'')	35,1	188–191°	F (F'') (F''')	ML mit Reagens T
44–48	„ „ „ „	42,2	F (F'') (F''')	21,9	187–191°	„ „ „	„ „
49–50	„ „ -(1:1)	45	„ „ „	—	—	—	nicht getrennt
51	«Gemisch» + 2% AcOH	13		—	—	—	nicht getrennt

⁵²) Vermutlich waren kleine Mengen der Derivate von Strophanthidin mit Digitoxose und 2-Desoxy-D-glucose darin enthalten.

Die ML der Fr. 18–37 (71 mg) und die ML der Fr. 40–48 (47,5 mg) wurden vereinigt (118,5 mg) und mit 60 mg Reagens T wie oben behandelt. Erhalten wurden 51 mg aldehydfreie Anteile (Pch F', F'' und F'''). Diese wurden an 2,5 g SiO₂ chromatographiert. Die mit Chf-Me von 4–20% Me-Gehalt eluierten Fraktionen lieferten 40 mg KEDDE-positives Material (Pch: F', F'' und F'''). Davon wurden 28 mg (entspricht ca. 500 g Samen) im System To-Bu-(2:1)/W auf Front durch präp. Pch zerlegt. Sie lieferten die folgenden Eluate: 16,4 mg F'; 16,8 mg F'' und 9,2 mg F'''.

Die 16,4 mg Eluat F' wurden an 1 g SiO₂ chromatographiert. Die mit Chf-Me-(90:10) und -(80:20) eluierten Anteile (4,8 mg) waren KEDDE-positiv und gaben aus W 1,5 mg farblose Plättchen, Smp. 147–152°.

Die 16,8 mg F''-Eluat lieferten nach Chromatographie an 1 g SiO₂ 5,2 mg KEDDE-positives Material (eluiert mit Chf-Me-(80:20)). Aus W 1,0 mg farblose Prismen, Smp. 165–175°.

Die 9,2 mg F'''-Eluat wurden an 0,6 g SiO₂ chromatographiert. Sie gaben 3,1 mg KEDDE-positives Material (eluiert mit Chf-Me-(90:10) und -(80:20)). Aus W 0,8 mg farblose Plättchen, Smp. 170–179°.

Auf Grund der direkt erhaltenen Kristalle sowie der Resultate von Tab. 6 hat dieser Extrakt aus 950 g Samen schätzungsweise die folgenden Mengen enthalten: 550 mg F, 20 mg F', 20 mg F'', 10 mg F''', 4200 mg G, sowie ungefähr 50 mg H, 90 mg J und ca. 180 mg K. Dabei ist aber vermutlich ein Teil des isolierten F bei der Fermentierung von H entstanden.

B. Untersuchung des Latex. - a) *Extraktion mit Pb(OH)₂-Reinigung.* Vom Inhalt von 2 Flaschen (= 1,12 kg ursprünglichem Latex) wurden die flüssigen Teile abgossen (1,2 l, pH = 5–6), der zähe Kautschuk-Klumpen mechanisch ausgepresst (gab noch 0,25 l Lösung) und mit Alk nachgewaschen. Es verblieben 251 g Gummi, KEDDE-negativ, verworfen. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum auf 400 ml eingeengt und mit 2,5 l Alk versetzt, wobei ein hellgrauer flockiger Niederschlag ausfiel. Er wurde durch ein mit gewaschenem Kieselgur (Celite 535) gedichtetes Filter abgenutscht und mit Alk gewaschen (Fällung ohne Kieselgur wog trocken 35 g, KEDDE-negativ, nicht untersucht). Das klare Filtrat wurde im Vakuum bei 50° Badtemperatur auf 450 ml eingeengt, mit 200 ml W versetzt und 3 mal mit je 250 ml Pe ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden im Gegenstrom mit 70-proz. Alk gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft (1,092 g Pe-Extr.). Die wässrig-alkoholischen Phasen wurden im Vakuum von Pe-Resten befreit, mit dem frisch aus 300 g Pb(OAc)₂ + 3 H₂O bereiteten, neutral gewaschenen und in 120 ml Alk aufgeschlemmten Pb(OH)₂ versetzt und 15 Min. energisch geschüttelt. Weitere Aufarbeitung wie bei DOLDER *et al.*¹⁷⁾ gab die in Tab. 2 genannten Ausbeuten.

b) *Extraktion ohne Pb(OH)₂-Reinigung.* Die Ausführung geschah wie bei a), nur wurde auf Behandlung mit Pb(OH)₂ verzichtet. Ausbeuten vgl. Tab. 2.

Trennung von 130 mg Äther-Extr. aus Versuch 4 (1,12 kg Latex). Das Material (enthaltend A, B, C, C' und C'') wurde an 4 g Al₂O₃⁵³⁾ chromatographiert (je 8 ml pro Fraktion). Die mit Be-Chf-Gemischen bis 50% Chf-Gehalt eluierten Fr. gaben nur 2,7 mg KEDDE-negatives Material. Be-Chf-(1:3) lieferte 3,3 mg Gemisch (A, B, C (C')), und reines Chf 3,8 mg (A, B, C, C' und C''). Die mit Chf-Me-(99:1) eluierten Anteile (10,3 mg) gaben aus Me-Ae 3,1 mg Strophanthidin (C''), Smp. 130–135°, nach Pch einheitlich. Mit Chf-Me-(98:2), -(95:5) und -(90:10) liessen sich noch 7,5 mg Material eluieren, das im Pch nur den C'' Fleck gab, das aber nicht kristallisierte. Chf-Me-Äthylacetat mit 2% AcOH gaben schliesslich noch 33 mg KEDDE-negatives Material.

Trennung von 600 mg Chf-Extr. aus Versuch 5 (0,56 kg Latex). Das Material wurde an 18 g Al₂O₃⁵³⁾ chromatographiert (je 60 ml pro Fr.). Die mit Be-Chf-Gemischen, reinem Chf sowie Chf-Me-Gemischen bis 2% Me-Gehalt eluierten Anteile (402 mg) waren KEDDE-negativ (verworfen). Die mit Chf-Me-(95:5) erhaltenen Eluate (54,1 mg) waren nur schwach positiv (Pch: D). Die mit Chf-Me-(90:10) abgelösten Anteile (13,9 mg) waren stark positiv (Pch: D), gaben aber keine Kristalle. Die angegebenen Mengen an Eluaten erlauben eine grobe Schätzung der im Latex enthaltenen Mengen an Cardenoliden.

C. Beschreibung der isolierten Stoffe. - Wo nichts erwähnt ist, erfolgte die Identifizierung nach Mischprobe, Farbreaktionen und Papierchromatogramm in direktem Vergleich.

A = Periplocymarin. Aus Me-Ae farblose Nadeln, Smp. 203–207°, $[\alpha]_D^{25} = +29,0^\circ \pm 2^\circ$ (*c* = 0,94 in Me).

⁵³⁾ Standardisiert nach H. BROCKMANN & H. SCHODDER, Ber. deutsch. chem. Ges. 74, 73 (1941).

B = *Cymar**in*. Aus An-Ae farblose Nadeln, Smp. 146–148°, $[\alpha]_D^{23} = +35,9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,27$ in Me). Die Hydrolyse im Mikromaßstab gab ein Genin, das im Pch wie Strophanthidin lief, und einen Zucker, der nach Pch mit Cymarose identisch war.

C = *Cymarol*. Aus An-Ae farblose Nadeln, Smp. 218–235°, $[\alpha]_D^{23} = +25,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in 80-proz. Me).

D = *Helveticosid*. Aus W farblose Nadeln, Smp. 155–158°, $[\alpha]_D^{23} = +29,0^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,75$ in Me).

F = *Desglucocheirotoxin*. Aus W farblose Plättchen, Smp. 186–191°, $[\alpha]_D^{26} = -1,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,4$ in Me), $[\alpha]_D^{24} = -3,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,13$ in Me). Zur Analyse wurde 72 Std. über CaCl_2 bei 760 Torr stehengelassen. Dieses Präparat wurde 17 Std. bei 0,01 Torr und 100° über P_2O_5 getrocknet, Gewichtsverlust 10,91%. Ber. 4 H_2O 11,51%.



Tri-O-acetyl-desglucocheirotoxin. 35 mg Präp. F vom Smp. 186–191° wurden in 1,5 ml Py und 1 ml $(\text{Ac})_2\text{O}$ 40 Std. bei 25° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 42 mg neutrales Rohprodukt. Aus Me-Ae 16 mg farblose Plättchen, Smp. 147–158°, $[\alpha]_D^{24} = +10,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,4$ in Chf).

Saure Hydrolyse von Subst. F. – a) *Mit KILIANI-Mischung*. 3 mg Subst. F vom Smp. 184–187° wurden nach früher beschriebener Methode ⁵⁴⁾ mit KILIANI-Mischung⁵⁵⁾ hydrolysiert. Der rohe Zucker zeigte in den zwei von KRAUSS & Mitarb.⁵⁶⁾ angegebenen Systemen IV und VII dieselbe Laufstrecke wie D-Gulomethylose.

b) *Nach MANNICH*⁵⁷⁾. 3 mg Subst. F vom Smp. 184–187° wurden in 1 ml An gelöst, mit 0,01 ml konz. HCl versetzt und verschlossen bei 20° stehengelassen. Nach je 1–2 Tagen wurden je 0,01 ml entnommen und im Pch (System von Fig. 4) geprüft. Nach 9 Tagen war der Fleck von Strophanthidin sehr deutlich, der auf der Startlinie verbleibende Fleck von F nur noch schwach.

Subst. F'. Die in Tab. 3 und 5 angegebenen Reaktionen mussten mit den Kristall-ML ausgeführt werden, ebenso folgende Hydrolyse: 3 mg amorphe Subst. F' wurde nach Vorschrift mild hydrolysiert. Das Genin lief im Pch (Chf/Fmd) wie Strophanthidol, der Zucker gab zwei Flecke entspr. Digitoxose und Cymarose. Letzterer war schwach; wir vermuten, dass er von einer Verunreinigung stammt.

Subst. F''. Die in Tab. 3 und 5 angegebenen Reaktionen mussten mit den Kristall-ML ausgeführt werden; ebenso folgende Hydrolyse: 4 mg wurden mild hydrolysiert. Das Genin (1,4 mg) enthielt nach Pch vorwiegend Strophanthidol und wenig Strophanthidin. Der Zucker (1,9 mg) zeigte im System Bu/W (14 Std.) zwei Flecke, entspr. Digitoxose und 2-Desoxyglucose.

Subst. F'''. Auch hier mussten die in Tab. 3 und 5 angegebenen Reaktionen mit den Kristall-ML ausgeführt werden. Die Xanthrydrol-Reaktion war sehr schwach positiv. 3 mg F-Kristall-ML wurden mild hydrolysiert. Das rohe «Genin» (0,3 mg) gab im Pch (System Chf/Fmd, Front) einen stationären Fleck (vermutlich F''') und einen mit Laufstrecke = 0,21 von Strophanthidol. Der rohe «Zucker» (2,3 mg) enthielt nach Pch noch F'''. Er wurde mit KILIANI-Mischung⁵⁵⁾ energisch hydrolysiert. Der hierauf erhaltene Zucker (2 mg) gab im Pch (To-Bu-(1:9)/W, Front) nach Entwicklung mit Vanillin-Perchlorsäure zwei Flecke mit Rf-Werten von 0,84 und 0,71. Rhamnose oder Fucose waren nicht feststellbar. Für den Nachweis von Glucose ist das verwendete Reagens nicht brauchbar.

G = *k-Strophanthin-β*. Aus W farblose Nadeln, Smp. 207–212°, $[\alpha]_D^{26} = +24,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in Me).

Fermentativer Abbau von G. 150 mg G vom Smp. 175–190° (noch Spur H enthaltend) wurden in 10 ml W mit 500 mg Strophanthobiase, 1 Tropfen AcOH und 1 ml To unter CO_2 14 Tage bei 37° stehengelassen. Aufarbeitung wie oben gab 126 mg Chf-Extrakt, nach Pch reines B, sowie 11 mg Chf-Alk-(2:1)-Extr., enthielt nach Pch wenig F.

⁵⁴⁾ Diss. J. H. RUSSEL, Basel 1960.

⁵⁵⁾ H. KILIANI, Ber. deutsch. chem. Ges. 63, 2866 (1930), Gemisch von 35 ml AcOH, 55 ml W und 10 ml konz. HCl.

⁵⁶⁾ M. T. KRAUSS, HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, J. Chromatogr. 3, 63 (1960).

⁵⁷⁾ C. MANNICH & G. SIEWERT, Ber. deutsch. chem. Ges. 75, 737 (1942).

Desglucocheirotol. 7 mg Desglucocheirotxin wurden nach früherer Vorschrift⁴⁵⁾ mit 1 mg NaBH₄ reduziert. Das Rohprodukt (4,8 mg) zeigte mit H₂SO₄ praktisch gleiche Färbung wie Convallatoxol. Im Pch (System von Fig. 5) gab es nur einen Fleck mit Laufstrecke wie F''.

Die Mikroanalyse wurde unter der Leitung von Herrn E. THOMMEN im Mikrolabor des Instituts ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Samen von *Castilla elastica* CERV. sind sehr reich an Cardenolid-glykosiden. Präparativ wurden Periplocymarin, Cymarin, Cymarol, Helveticosid, Desglucocheirotxin, k-Strophanthin- β , sowie Spuren von drei Stoffen (F', F'' und F''') in Kristallen isoliert. F' ist vermutlich mit Helveticosol identisch. Papierchromatographisch liess sich ausserdem die Anwesenheit von Corchorosid A, Cheirotxin, k-Strophanthosid und einer nicht identifizierten Substanz J feststellen. Hauptglykoside sind Cymarin, k-Strophanthin- β und Periplocymarin. Der Milchsaft derselben Pflanze enthält kleine Mengen von Periplocymarin, Cymarin, Cymarol und Helveticosid, sowie Periplogenin und Strophanthidin. Die zwei zuletzt genannten freien Genine waren in den Samen nicht anwesend.

In Bezug auf die Glykoside unterscheidet sich *Castilla elastica* erheblich von den zwei anderen bisher untersuchten Cardenolid-führenden Vertretern der Moraceen (*Antiaris toxicaria* und *Streblus asper*) und ähnelt mehr einer Gruppe von *Strophanthus*-Arten.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

106. Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*)¹⁾

von Theodor Wieland

(23. III. 61)

Für den Teil der Chemie, den wir heute mit Naturstoffchemie bezeichnen, hat zu Anfang des letzten Jahrhunderts BERZELIUS den Namen «organische» Chemie geprägt. Man sagt und hört oft, die organische Chemie habe sich nach dieser ihrer Taufe von ihrem ursprünglichen Inhalt, der Chemie der Organismen, abgewandt, doch scheint es mir, dass unser Fach in den 1½ Jahrhunderten seiner Existenz fortwährend mit der Natur verbunden blieb, die immer die grosse Lehrmeisterin und Zielsetzerin gewesen ist. Ob beim Bemühen um eine Chininsynthese der erste brauchbare Anilinfarbstoff, Mauvein, erfunden wird, ob ein Jahrhundert später die Ausscheidungsprodukte von Mikroorganismen, mit denen sie sich ihre Gegner oder Mitesser vom Hals halten, als die wundersamsten Antiinfektionsstoffe erkannt werden, ob durch die Beschäftigung mit dem Kautschuk und der Cellulose das Gebiet der makromolekularen Chemie eröffnet wird oder ob die unerreichbare katalytische Wirkung der Enzyme zur Aufklärung und Nachahmung reizt – immer ist es die Beziehung zur

¹⁾ Vortrag, gehalten an der Winterversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Fribourg am 11. Februar 1961. Gilt als 20. Mitteilung in der Reihe «Über die Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes». 19. Mitt. siehe Fussnote ²⁰⁾. Veröffentlicht laut besonderem Beschluss des Redaktionskomitees.