

Herrn Prof. R. SCHWYZER möchte ich für seine Anregungen und Unterstützung während dieser Arbeit herzlich danken. Herrn R. SCHAUB danke ich für seine wertvolle technische Mitarbeit, Herrn Dr. W. PADOWETZ für die analytischen Daten, Herrn Dr. H. MAJER für die pK-Messungen und Herrn E. VON ARX für die Ausführung der Papierchromatogramme.

SUMMARY

The side reactions observed on acid hydrolysis (6 N HCl; 20 hrs at 115°C) of carbobenzoxy derivatives of tyrosine containing peptides were investigated by hydrolyzing carbobenzoxy-L-tyrosine or O-benzyl-L-tyrosine under the same conditions or by reacting L-tyrosine with benzylchloride in the presence of 6N HCl. In every instance the reaction mixture contained besides tyrosine 3 new products distinguishable by paper chromatography. The fractionation of the mixture yielded a mono-benzylated tyrosine considered to be 3-benzyl-L-tyrosine (I) and two different products which were shown to contain 2–3 benzyl residues in the aromatic ring. These results demonstrate that the benzyl cation formed in the course of the hydrolysis of carbobenzoxy derivatives of tyrosine containing peptides transforms L-tyrosine into derivatives substituted in the aromatic nucleus.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

177. Die Glykoside von *Streblus asper* LOUR. 1. Mitt. ¹⁾

Glykoside und Aglykone, 237. Mitteilung ²⁾

von M. P. Khare, S. S. Bhatnagar ³⁾, O. Schindler und T. Reichstein

(1. VI. 62)

Streblus asper LOUR. (*Moraceae*) ist ein kleiner, immergrüner, zweihäusiger Baum oder Strauch ⁴⁾, der in den trockenen Teilen von Indien, Ceylon, Malaya, Vietnam und Thailand bis zu 600 m Höhe ü. M. heimisch ist. Die rauhen Blätter dienen zum Polieren von Holz und Elfenbein. Extrakte der Blätter vermögen Milch zum Gerinnen zu bringen und können an Stelle von Labferment zur Bereitung von Käse verwendet werden ⁵⁾ ⁶⁾. Die Blätter werden in beschränktem Masse auch medizinisch verwendet ⁷⁾ ⁸⁾. VISSER ⁹⁾ erhielt aus der Rinde einen Bitterstoff, der weder ein Glykosid noch ein Alkaloid sein soll. Über weitere chemische Befunde ist uns nichts bekannt, hin-

¹⁾ Auszug aus Diss. M. P. KHARE, Basel 1959.

²⁾ 236. Mitt.: E. ABISCH & T. REICHSTEIN, *Helv.* 45, 1375 (1962).

³⁾ Colonel S. S. BHATNAGAR, Director CAIUS RESEARCH LABORATORY, St. Xavier's College, Cruickshank Rd., Bombay 1, India.

⁴⁾ Vgl. G. E. C. FISCHER, *Flora of the Presidency of Madras, Part VIII*, p. 1353, London (1928) sowie A. ENGLER & K. PRANTL: *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, III. Teil, IV. Abt., p. 77, Leipzig 1894.

⁵⁾ NOSHER N. DASTUR, *Indian Farming* 9, 451 (1949); *Chem. Abstr.* 46, 2706 i (1952).

⁶⁾ J. SRI RAM & K. K. REDDI, *J. Indian Inst. Sci.* 35A, 215 (1953); *Chem. Abstr.* 48, 214f (1954).

⁷⁾ K. HEYNE, *De Nuttige Planten van Nederlandsch Indie*, I, 551, 2e Druk (Buitenzorg 1927).

⁸⁾ R. N. CHOPRA, I. C. CHOPRA, K. L. HANDA & L. D. KAPUR, *CHOPRA'S Indigenous Drugs of India*, 2ed., p. 526 (Calcutta 1958).

⁹⁾ H. C. VISSER, *Nederl. Tijdschr. Farmac. Chem. en Toxicol.* 8, 204 (1896).

gegen sind in anderen Moraceen Cardenolide gefunden worden¹⁰⁾. Wir berichten hier über eine Untersuchung der Wurzelrinde.

Beschaffung des Ausgangsmaterials. Zur Untersuchung standen uns drei Proben von Wurzelrinde zur Verfügung, die der eine von uns (S. S. B.) von Herrn Dr. T. S. N. RAO, St. Xavier's College, Bombay, erhielt, der auch die botanische Bestimmung durchführte¹¹⁾. Das Material war im Schatten getrocknet worden. Ein zur Probe c gehöriges Herbarmuster ist in Fig. 1 abgebildet.



Fig. 1. *Streblus asper* LOUR. Herbarmuster einer weiblichen Pflanze, gesammelt zusammen mit Rindenprobe c

¹⁰⁾ Bei den Moraceen sind Cardenolide am längsten bekannt in *Antiaris toxicaria* LESCH., vgl. F. DOLDER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 38, 1364 (1955), und frühere Lit. daselbst sowie C. JUSLÉN, *Diss. Helsinki*, und W. WEHRLI, *Diss. Basel*, die demnächst erscheinen. N. G. BISSET fand Cardenolide auch reichlich in den Samen von *Castilla elastica* CERV., die kürzlich von G. R. ADAMS & S. WILKINSON, *J. of Pharmacy & Pharmacol.* 13, 279 (1961), sowie von P. BRAUCHLI, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 44, 904 (1961), genauer untersucht wurden.

¹¹⁾ Wir danken Herrn Dr. RAO auch hier für seine Mühe. Ferner danken wir den CIBA PHARMACEUTICAL RESEARCH LABORATORIES, Bombay, sowie der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, auch hier für ihre Hilfe bei der Beschaffung des Materials und für die Übernahme der Kosten.

Probe a. 9,1 kg, gesammelt im Februar 1956 im Borivli National Park, Indien. In Basel erhalten im Febr. 1957.

Probe b. 20 kg, gesammelt im Dezember 1957 im Wald beim Dorf Kashmera, ca. 35 km von Bombay entfernt. In Basel erhalten im Jan. 1958.

Probe c. 50 kg, gesammelt im März 1958 am gleichen Ort wie b. Erhalten in Basel im Sept. 1958.

Alle drei Proben erreichten uns in ausgezeichnetem Zustand.

Extraktion und papierchromatographische Prüfung der Extrakte.

Vorprüfungen zeigten, dass das Material keine Alkaloide, wohl aber Cardenolidglykoside enthielt. Für die präparative Extraktion wurde das früher beschriebene Verfahren¹²⁾ benützt. Das gepulverte Material wurde (ohne mit Wasser zu weichen) direkt mit Alkohol steigender Konzentration (50→95%) perkoliert. Nach Reinigung mit Pb(OH)₂ und Entfernung des Alkohols wurde aus wässriger Lösung fraktioniert mit Äther, Chloroform und Chloroform-Alkohol-(2:1)-Gemisch ausgeschüttelt. Zur Extraktion gelangten 8,5 kg Probe a (in zwei Chargen), 12 kg von Probe b¹³⁾ und die 50 kg von Probe c¹⁴⁾. Über die erhaltenen Ausbeuten orientiert Tab. 1.

Tabelle 1. *Ausbeuten an Extrakten aus Wurzelrinde von Streblus asper*¹⁵⁾

Art des Extr.	Probe a				Probe b		Probe c	
	Erste Charge 2 kg		Zweite Charge 6,5 kg		12 kg		50 kg ¹⁶⁾	
	in g	in %	in g	in %	in g	in %	in g	in %
Ae-Extr. roh . . .	2,4	0,12	17,09	0,26	37,75	0,314	} 303,0	} 0,606
„ „ ger. ¹⁷⁾ . . .	1,74	0,087	6,21	0,096	14,7	0,12		
Chf-Extr.	3,8	0,19	12,30	0,19	35,5	0,295		
Chf-Alk- 2:1-Extr.	9,04	0,45	23,35	0,36	37,2	0,31		

Die verbliebene wässrige Phase zeigte mit KEDDE-Reagens¹⁸⁾ keine Violettfärbung mehr und war nicht mehr bitter; sie wurde verworfen.

Alle drei Extrakte zeigten positive KEDDE-Reaktion¹⁸⁾. Bei der papierchromatographischen Untersuchung in drei Systemen (und teilweise verschiedener Zeitdauer, vgl. Fig. 2–6) liessen sich insgesamt ca. 19 Cardenolide nachweisen, die zunächst mit Buchstaben (vgl. Tab. 2) benannt wurden. Die zugehörigen Flecke werden mit den-

¹²⁾ J. v. EUW, H. HESS, P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 1821 (1951).

¹³⁾ Wir danken Herrn Dr. J. MÜLLER, CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, für die Extraktion dieses Materials.

¹⁴⁾ Wir danken den Herren Dr. M. SUTTER & R. ENDRES, CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, für die Extraktion dieser grossen Probe.

¹⁵⁾ Abkürzungen für Lösungsmittel usw., vgl. Einleitung zum Exp. Teil.

¹⁶⁾ Bei Probe c wurde auf die Gewinnung eines Ae-Extr. verzichtet.

¹⁷⁾ Gereinigt durch Verteilung zwischen 80-proz. Methanol und Petroläther.

¹⁸⁾ D. L. KEDDE, *Diss. Leyden* 1946; I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.* 52, 643 (1952). Fast alle Butenolide geben mit diesem Reagens eine blaviolette Färbung. Empfindlichkeit bei direktem Auftropfen auf Papier ca. 0,002 mg, im Pchr ca. 0,005 mg.

selben Buchstaben bezeichnet. Die ungefähre Verteilung auf die drei Extrakte ist aus Tab. 2 ersichtlich; sie war bei allen 3 Proben praktisch gleich.

Tabelle 2. *Papierchromatographische Prüfung der in Tabelle 1 genannten Extrakte*

Extr. Art	Flecke im Papierchromatogramm, entwickelt mit KEDDE-Reagens
Ae-Extr.	α , β , A
Chf-Extr.	α , A, B, C, D, E, E', E'', E''', F, G, G', H
Chf-Alk-(2:1)-Extr. . .	J, K, L, M, N

Trennung der Extrakte. Bisher wurden nur die Ae- und Chf-Extrakte präparativ getrennt. Der Chf-Alk-(2:1)-Extrakt wurde nur orientierend mit Fermenten geprüft (siehe unten).

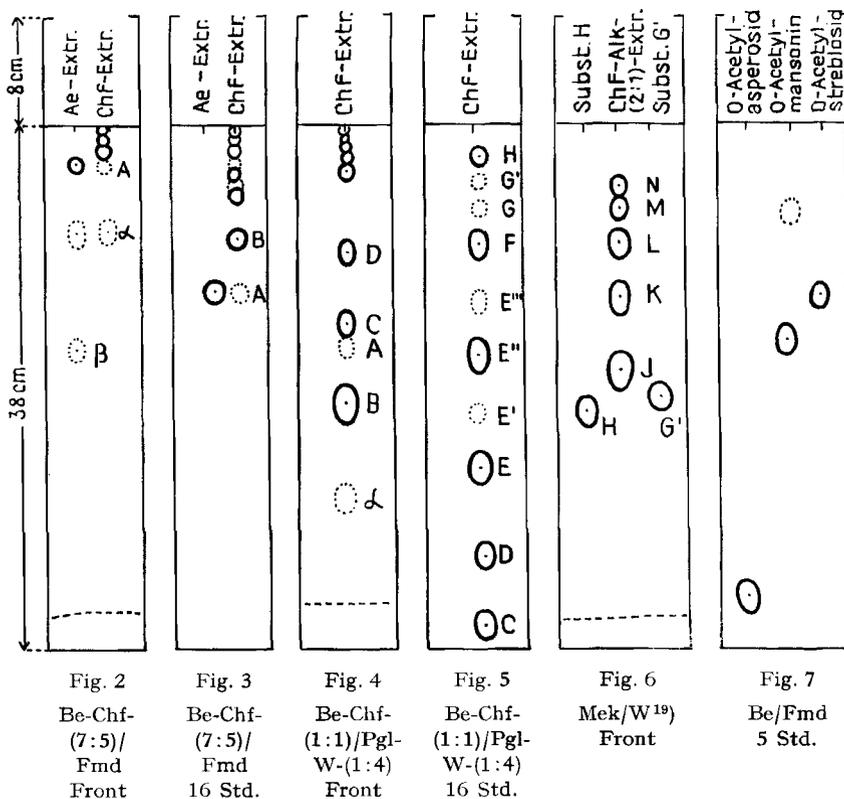


Fig. 2-7 sind Beispiele zur Kontrolle durch Papierchromatographie¹⁵⁾

Ausführung auf WHATMAN Nr. 1 Papier wie früher²⁰⁾ beschrieben, entwickelt mit KEDDE-Reagens¹⁸⁾. Wo keine Front (gestrichelt) eingezeichnet ist, wurde abtropfen gelassen.

¹⁹⁾ Beladung mit Wasser entspr. 35% des Papiergewichtes (nach v. EUW, vgl. Exper. Teil).

²⁰⁾ a) O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 108 (1951); b) E. SCHENKER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 680 (1954); c) F. KAISER, *Chem. Ber.* 88, 556 (1955).

Tabelle 3. Die wichtigsten Eigenschaften der in papierchromatographisch reiner Form aus der Wurzelrinde von Streblus asper isolierten Stoffe und einiger ihrer Derivate¹⁵⁾

Substanz	Smp.	[α] _D in Me ²³⁾	Bruttoformel (in Klammern unsichere Werte ²⁴⁾)	OCH ₃ Zahl	Kette- Reaktion ¹⁸⁾	Keller- Reaktion ¹⁹⁾	Xanthrol- Reaktion ²⁰⁾	Zucker- prüfung ²⁷⁾	Fluoreszenz- Reaktion ²⁸⁾	UV.-Max. ²⁹⁾		Geschätz- ter Gehalt ³⁰⁾ in %
										Buten- olid mμ (log ε)	CO- gebiet mμ (log ε)	
α = Kamalosid . . .	174-178°	+ 10,6°	C ₃₁ H ₄₈ O ₉ ³¹⁾	2	+	-	-	+	-	218 (4,18)	S 295 1,73	0,002
β	amorph		(C ₃₁ H ₄₈ O ₉)		+	-	-	-	-	218 (3,90)	?	0,0002
A = Asperosid . . .	198-205°	- 19,5°	C ₃₁ H ₄₈ O ₉ ³¹⁾	2	+	-	-	+	(+) ³²⁾	217 (4,19)	270 (2,42)	0,01
Di-O-acetyl-A . .	161-162°	- 22,2° (Chf)	C ₃₅ H ₅₂ O ₁₁ ³¹⁾	2	+	-	-	-	-	217 (4,24)	302 (1,50)	0,02
B = Streblolid . . .	153-158°	+ 25,3°	C ₃₁ H ₄₆ O ₁₀ ³¹⁾	2	+	-	-	+	-	216,5 (4,12)	S 280 (2,1)	0,003
O-Acetyl-B . . .	amorph		(C ₃₁ H ₄₆ O ₁₀)		+	-	-	+	-	217 (4,08)	-	0,001
O-Benzoyl-B . . .	„		(C ₃₁ H ₄₆ O ₁₀)		+	-	-	+	-	217 (4,19)	S 280 (1,95)	0,002
C = Indrosid . . .	222-228°	(+ 18,0°)	(C ₃₁ H ₄₆ O ₁₀)		+	-	-	+	-	216 (4,14)	S 275 (2,5)	0,0005
D = Lucknosid . . .	253-259°	- 4,0°	(C ₃₁ H ₄₆ O ₁₀)		+	-	-	+	-	214 (4,12)	S 280 (2,6)	0,0005
F	175-182°	- 12,6°	C ₃₁ H ₄₆ O ₁₀ ³³⁾	2 ³⁴⁾	+	-	-	+	-	217 (4,11)	S 280 (2,2)	0,003
G	amorph	- 1,8°	(C ₃₀ H ₄₆ O ₉)		+	-	-	+	-	-	-	?
G'	„	- 12,5°	(C ₃₀ H ₄₆ O ₉)		+	-	-	+	-	-	-	-
H	„	- 15,4°	(C ₃₁ H ₄₆ O ₁₀)		+	-	-	+	-	-	-	-
O-Acetyl-H	„		(C ₃₁ H ₄₆ O ₁₀)		+	-	-	+	-	-	-	-
U = MKh 6	210-220°		(C ₃₀ H ₅₀ O ₉) ³⁵⁾	1	-	-	-	+	-	-	-	-

Resultate: Durch die unten erwähnten Trennungen liessen sich aus den Ae- und Chf-Extrakten die sechs Substanzen α , A, B, C, D und F in einheitlichen Kristallen isolieren. Bei allen handelte es sich um neue Cardenolid-Glykoside²¹⁾. Sie erhielten die in Tab. 3 angegebenen Namen. Ausserdem wurden vier weitere Cardenolide β , G, G' und H in amorpher aber papierchromatographisch einheitlicher Form erhalten, sowie ein KEDDE-negativer krist. Stoff U (MKh 6).

Die wichtigsten Eigenschaften dieser 10 Stoffe sind in Tab. 3 zusammengestellt. Dort ist auch eine rohe Schätzung der in der Rinde ungefähr enthaltenen Menge angegeben.

Von den vier weiteren Stoffen E, E', E'' und E''', die sich besonders im System von Fig. 5 nachweisen lassen, konnte keine in reiner Form erhalten werden²²⁾. Im Folgenden wird die Durchführung der Trennung kurz beschrieben.

Ausführung der Trennungen

Trennung des Äther-Extrakts und Isolierung der Substanzen α = Kamalosid, β und A = Asperosid³⁶⁾.

Im Äther-Extrakt war zunächst papierchromatographisch nur α und A nachweisbar. Nach Chromatographie an SiO₂ konnte ein Teil A in reinen Kristallen gewonnen werden. Die verbleibenden Gemische wurden an Al₂O₃ chromatographiert, wobei aber nur eine teilweise Trennung entstand. In den leichter eluierbaren Anteilen wurde jetzt neben α auch noch die Substanz β sichtbar, die nur in Spuren anwesend war. Durch

²¹⁾ Vgl. M. P. KHARE, Diss. Basel 1959 und folgende Mitteilung.

²²⁾ Isoliert wurden einige binäre Gemische, so E + G (7 mg), E + E' (28 mg), E'' + E' (28 mg) und E''' + E'' (24 mg).

²³⁾ Werte in Klammern mussten mit amorpher ML von Kristallen bestimmt werden.

²⁴⁾ Zur Berechnung der $\log \epsilon$ im UV.-Absorptionsspektrum benützt.

²⁵⁾ Ausführungsform vgl. J. v. EUW & T. REICHSTEIN, Helv. 37, 883 (1948).

²⁶⁾ V. ARREGUINE & P. E. PASQUALIS, Rev. Univ. Nac. Cordoba 32, 439 (1945); Ausführung nach P. BELLET, Ann. pharmac. franç. 8, 471 (1950); M. PESEZ, *ibid.* 10, 104 (1952).

²⁷⁾ P. R. O. BALLY, K. MOHR & T. REICHSTEIN, Helv. 34, 1740 (1951).

²⁸⁾ a) Mit 85-proz. H₃PO₄ auf Porzellanplatte oder im Röhrchen nach PESEZ, vgl. A. PETIT, M. PESEZ, P. BELLET & G. AMIARD, Bull. Soc. chim. France [5], 17, 288 (1950) sowie P. BELLET, Ann. pharmac. franç. 8, 471 (1950); M. PESEZ, *ibid.* 8, 746 (1950); b) Mit Trichloressigsäure auf Papier, vgl. K. B. JENSEN, Acta pharmacol. toxicol. 9, 99 (1953); L. FAUCONNET & K. KREIS, Pharmac. Acta Helv. 32, 253 (1957); c) Mit SbCl₃ auf Papier, vgl. D. LAWDAY, Nature 170, 415 (1952); HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. 42, 977 (1959).

²⁹⁾ In Alk, vgl. Fig. 9 und 10. S = Schulter. $\log \epsilon$ bei analysierten Stoffen jeweils auf die angegebene Formel berechnet. Bei β auf C₃₁H₄₈O₉ = 564,69, bei C, D und H auf C₃₁H₄₆O₁₀ = 578,68, bei G und G' auf C₃₀H₄₆O₉ = 550,67. Begründung vgl. folgende Mitteilung²¹⁾. Nur B zeigte im Carbonylgebiet ein deutliches Maximum. Bei den anderen Stoffen waren offenbar kleine Mengen stark absorbierender Verunreinigungen anwesend.

³⁰⁾ Rohe Schätzung auf Grund der Ausbouts sowie der Stärke der Flecke im Pchr.

³¹⁾ Formel inzwischen sichergestellt²¹⁾.

³²⁾ Verursacht durch Verunreinigung mit 16-Dehydro-cardenolid, sichtbar im UV.

³³⁾ Formel auch durch hydrolytische Spaltung wahrscheinlich gemacht²¹⁾.

³⁴⁾ Nur indirekt aus Laufstrecke des Zuckers im Pchr abgeleitet.

³⁵⁾ Formel unsicher, Mol.-Gewicht willkürlich angenommen.

³⁶⁾ Im Exp. Teil ist nur die Trennung des Materials aus Probe a (6,5 kg Droge) beschrieben. Die Extrakte der anderen Proben wurden gleich getrennt und gaben praktisch gleiche Resultate.

präparative Papierchromatographie^{37) 38)} solcher Gemische wurden α und β getrennt, von denen α in Kristallen, β aber nur in amorpher Form erhalten wurde.

*Trennung des Chloroform-Extrakts*³⁶⁾. Dieses Material enthielt nach Papierchromatogramm mindestens 13 Stoffe (vgl. Tab. 2). Es wurde zunächst durch Chromatographie an SiO_2 in 3 Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 enthielt α , (A), B und (C). Eine Probe wurde durch präparative Papierchromatographie getrennt, worauf B in reinen Kristallen isoliert wurde. Dieser Versuch diente zur Feststellung, dass B kein Kunststoff ist, das aus Al_2O_3 entsteht. Die Hauptmenge von Gruppe 1 wurde durch Chromatographie an Al_2O_3 zerlegt, worauf sich A und B in Kristallen isolieren liessen. Daneben wurden etwas Kristalle einer KEDDE-negativen Substanz U(MKh6) erhalten, sowie Gemische von α und β , aus denen sich α nach nochmaliger Anreicherung an SiO_2 durch präparative Papierchromatographie gewinnen liess.

Gruppe 2 bestand aus fast reinem B und lieferte nach Al_2O_3 -Chromatographie diesen Stoff in Kristallen. Gruppe 3 enthielt vorwiegend die stärker polaren Stoffe. Sie wurden mit den amorphen Anteilen der Gruppe 1 und 2 vereinigt und das Ganze (5,867 g) durch Verteilungschromatographie in einer Säule mit Propylenglykol-Wasser-(1:4) an gereinigtem Kieselgur³⁹⁾ und Benzol-Chloroform-Gemischen in 114 Fraktionen aufgetrennt. Über das Ergebnis orientiert Fig. 8 sowie Tab. 13 (Exp. Teil.)

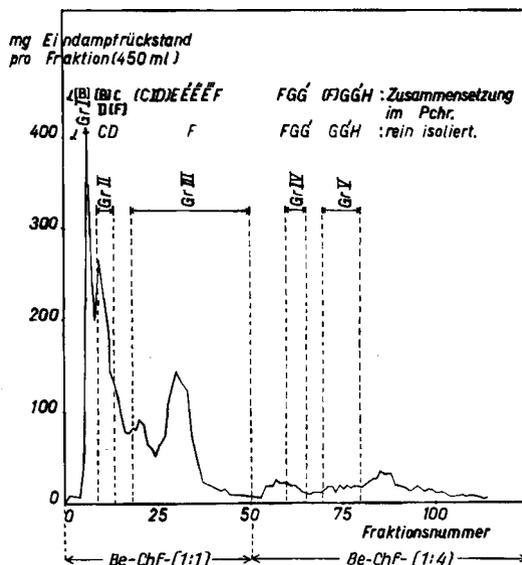


Fig. 8. Verteilungschromatographie des Chloroform-Extraktes aus *Streblus asper*

Gruppe I enthielt α und B. Nach präparativer Papierchromatographie wurde α in reinen Kristallen isoliert.

Gruppe II enthielt (B), C, D und E. Nach präparativer Papierchromatographie und anschliessender Reinigung an Al_2O_3 liessen sich C und D in papierchromatogra-

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

³⁸⁾ Es wurde das System Be-Chf-(7:5)/Fmd verwendet.

³⁹⁾ H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 36, 357 (1953).

phisch reiner Form gewinnen. D kristallisierte gut, von C liess sich nur eine sehr kleine Menge in Kristallen fassen, die Hauptmenge blieb amorph. Ferner wurde noch wenig amorphes E-Konzentrat erhalten, das aber noch D enthielt.

Gruppe III enthielt (C) (D), E, E', E'', E''' und F. Eine gewisse Trennung liess sich mit Reagens T von GIRARD & SANDULESCO⁴⁰⁾ erzielen mit dem sich E''' vollständig und E'' teilweise umsetzte. Die nicht in Reaktion getretenen Anteile a) (= «aldehydfreies» Material) enthielten aber auch nach Wiederholung der Behandlung noch (C) (D), E, E', E'' und F.

Nach präparativer Papierchromatographie liess sich die Hauptkomponente F daraus in Kristallen isolieren. Die Eluate der E'' Zonen (28 mg) enthielten noch wenig E' und blieben amorph. E und E' konnten nicht getrennt werden; etwa 28 mg eines Gemisches wurden erhalten, das etwa gleiche Mengen beider Komponenten enthielt.

Aus den in Reaktion getretenen Anteilen wurden die vermutlichen Aldehyde (Teil b) nach früherer Vorschrift⁴¹⁾ in Freiheit gesetzt. Dabei resultierte ein Gemisch von E'' und E'''. Diese zwei Stoffe zeigten sehr ähnliche Eigenschaften, sie konnten bisher nicht getrennt werden.

Gruppe IV enthielt F, G und G'. Die Trennung wurde durch präparative Papierchromatographie durchgeführt, wobei die 3 Stoffe in papierchromatographisch reiner, aber amorpher Form erhalten wurden. Beim F Konzentrat gelang es auch nach Impfen nicht, Kristalle zu erhalten.

Gruppe V enthielt G, G' und H.

Orientierende Prüfung des Chf-Alk-(2:1)-Extrakts

Dieses Material zeigte im Papierchromatogramm die Flecke J, K, L, M und N. Eine Probe (50 mg) wurde mit Pilzamyrase⁴²⁾ behandelt und die Fermentierung mit den nicht angegriffenen Anteilen wiederholt (total 4 Wochen). Die Aufarbeitung wie in früheren Fällen⁴³⁾ lieferte total 15 mg Chf-Extrakt enthaltend vorwiegend D, E''', G, G' und H, sowie 15 mg Chf-Alk-(2:1)-Extrakt, enthaltend J, K, L, (M) und (N). Die ursprünglichen Flecke M und N waren also weitgehend verschwunden und dafür mehrere rascher laufende Flecke entstanden. Zu weitgehende Schlussfolgerungen sind kaum zulässig, da bei der langen Einwirkungszeit auch oxydative Einwirkung möglich ist. Es scheint aber, dass gewisse Mengen von Polyglykosiden mit endständiger Glucose anwesend sind⁴⁴⁾.

Besprechung der isolierten Stoffe

In Tab. 3 sind noch die analytischen Daten und die Eigenschaften der isolierten Stoffe und einiger daraus hergestellter Derivate zusammengestellt.

Tabelle 4 gibt die Farbreaktionen und Tabelle 5 die Resultate der biologischen Prüfung für drei der krist. Glykoside.

⁴⁰⁾ A. GIRARD & G. SANDULESCO, *Helv.* 19, 1095 (1936).

⁴¹⁾ O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 521 (1951).

⁴²⁾ Wir danken der SCHWEIZERISCHEN FERMENT AG, Basel, bestens für dieses Material. Es handelt sich um ein Glucosidase haltiges Fermentprodukt aus *Aspergillus oryzae*.

⁴³⁾ R. REES, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 42, 1052 (1959).

⁴⁴⁾ Die Untersuchung des Chf-Alk-(2:1)-Extr. wird von A. MANZETTI demnächst beschrieben.

Tabelle 4. *Farbreaktionen der isolierten Stoffe mit 84-proz. und konz. H₂SO₄*⁴⁵⁾

Substanz	H ₂ SO ₄	0 Min.	5 Min.	20–30 Min.	60 Min.	2 Std.	5 Std.
Kamalosid α	84% 98%	orange	orange	orangerot	orangerot	grauviolett	violett
Asperosid A	84% 98%	hellgelb intens. gelb	gelbbraun grauviolett	hellgrün violett	hellgrün blau	hellgelb blaugrün	hellgelb blaugrün
Streblosid B	84% 98%	gelb orange gelb	orange gelb orange gelb	graugrün braungrün	grün dunkelgrün	hellgrün „	gelb hellbraun
Indrosid C	84% 98%	gelb „	orange gelb gelb	orange gelb gelb	orange gelb gelb	gelbbraun grünblau	grünblau blau
Lucknosid D	84% 98%	farblos hellviolett	farblos hellviolett	hellviolett hellorange	hellviolett orange gelb	hellviolett violett	hell karmin karmin
Subst. F	84% 98%	gelb „	gelb orange gelb	orange gelb „	orange gelb orange	braunviolett braun	violett braunviolett
Subst. G	84% 98%	gelb „	rotbraun „	braun „	braun „	braun „	braun „
Subst. H	84% 98%	hellviolett gelb	orange orange gelb	orange orange gelb	orange orange gelb	gelbbraun orange gelb	violettblau orangebraun
Subst. U (MKh 6)	84% 98%	orange gelb „	orange gelb gelb	orange gelb gelbviolett	gelbgrün violett-grün	grün dunkelgrün	grün dunkelgrün

Die Substanz β wurde nicht geprüft, da das Präparat noch sehr unrein war.

Tabelle 5. *Biologische Prüfung*⁴⁶⁾

Substanz	Isoliertes Froschherz 47)	Isoliertes Säugerherz ⁴⁷⁾	HATCHER-Test an der Katze Einheiten p. mg
Ouabain als Standard	1	1	8,9
Digitoxin zum Vergleich			1,8–2,0
α = Kamalosid	0,1	0,1 (Kaninchen)	nicht geprüft
A = Asperosid	0,2–0,4		1,8
B = Streblosid	2	2 (Kaninchen und Katze)	5,5

⁴⁵⁾ Ca. 0,5 mg Substanz in weisser Porzellantüpfelplatte mit 2 Tropfen Säure rasch verrieben und bedeckt stehen gelassen.

⁴⁶⁾ Wir danken den Herren der biologischen Abteilung der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, auch hier für die Durchführung der Prüfung und die Überlassung der Resultate.

⁴⁷⁾ Zahl gibt an, wieviel stärker der Stoff wirksam war als Ouabain.

Bemerkenswert scheint uns, dass die hier isolierten Cardenolide, soweit sie untersucht werden konnten, *zwei* Methoxygruppen enthielten. Ähnliches wurde, soweit uns bekannt, bisher nur bei einigen Glykosiden aus *Mansonia altissima* A. CHEV.^{48a-c)} beobachtet. Auch die KEDDE-negative Substanz U enthielt Methoxyl, aber nur eine Gruppe.

Es wurden daher noch zwei Vorversuche unternommen, um festzustellen, ob eventuell teilweise identische Stoffe vorliegen. Herr Dr. UFFER⁴⁹⁾ stellte uns u. a. eine Probe der schwach polaren Anteile des Glykosidgemisches aus der Rinde von *Mansonia altissima* A. CHEV. zur Verfügung. Nach Papierchromatogrammen (System von Fig. 3) war weder Asperosid (A) noch Streblosid (B) darin anwesend; das Material gab eine Anzahl KEDDE-positiver Flecke, die alle langsamer liefen. Ferner überliess uns Herr Prof. FRÈREJACQUE je eine Probe Mansonin ($C_{33}H_{48}O_{11}$) und O-Acetyl-mansonin ($C_{35}H_{50}O_{12}$)⁵⁰⁾. Erstere ist eine Mono-O-acetyl-Verbindung die sich von einem Glykosid $C_{31}H_{46}O_{10}$ ableitet. Zum Vergleich haben wir daher die voll acetylierten Stoffe be-

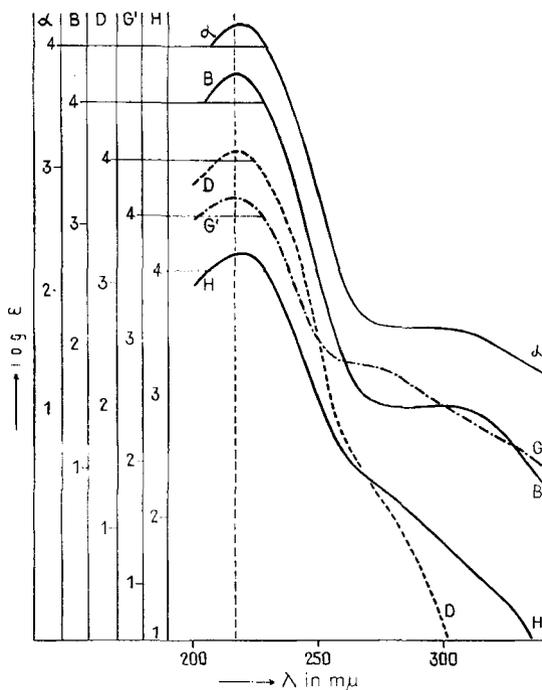


Fig. 9. UV.-Absorptionsspektren in Alkohol⁵²⁾
Genauere Lage und Höhe²⁰⁾ der Maxima vgl. Tabelle 3

⁴⁸⁾ a) M. FRÈREJACQUE, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. 233, 1220 (1951); b) A. UFFER, Helv. 35, 528 (1952) und frühere Lit. daselbst; c) W. SANDERMANN & H. H. DIETRICH, Holz als Roh- und Werkstoff 17, 88 (1959).

⁴⁹⁾ Wir danken Herrn Dr. A. UFFER, SOCIÉTÉ ANONYME CIBA, 25, rue Léopold, Courbevoie, Bruxelles, Belgique, bestens für dieses Material. Es wurde aus der von Herrn W. NIKLAUS (†, Man, Côte d'Ivoire) erhaltenen Rinde^{48b)} gewonnen.

⁵⁰⁾ Wir danken Herrn Prof. M. FRÈREJACQUE, Paris auch hier bestens für diese Substanzproben.

nützt. Im System β , β' -Dihydroxydiäthylsulfid/Benzol zeigten O-Acetyl-streblosid und Acetyl-mansonin gleiche Laufstrecken; wie aus Fig. 7 ersichtlich, liessen sie sich in einem anderen System differenzieren. Auch die Farbrekationen mit 84-proz. und konz. H_2SO_4 waren etwas verschieden. Es dürfte sich demnach um nahe verwandte, aber verschiedene Stoffe handeln.

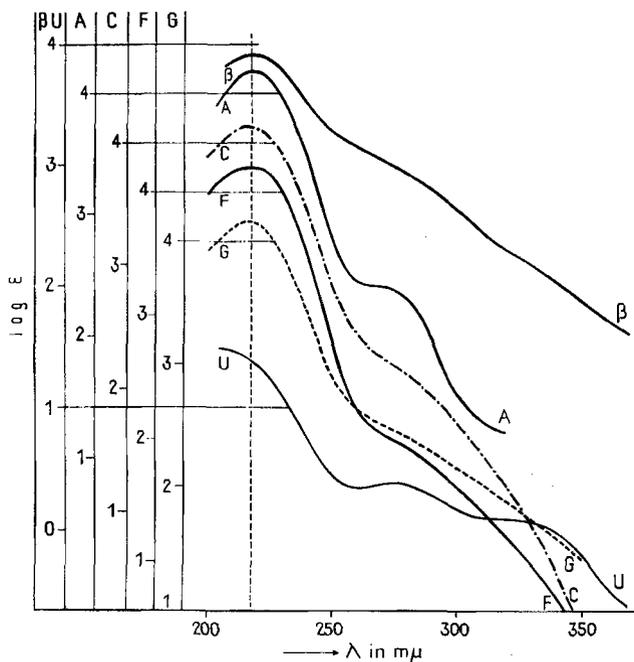


Fig. 10. UV.-Absorptionsspektren in Alkohol⁵²⁾
Genauere Lage und Höhe²⁹⁾ der Maxima vgl. Tabelle 3

Fig. 9 und 10 geben die UV.-Absorptionsspektren der 10 isolierten Cardenolide. Aus der Intensität der Butenolidbande ist ersichtlich, dass auch die amorphen Präparate offenbar nicht mehr sehr viel Ballaststoffe enthielten. Die sichere Feststellung eventuell vorhandener Keto- oder Aldehydbanden ist selbstverständlich bei solchen amorphen Präparaten kaum möglich²⁹⁾. Eindeutig lässt sich auf Grund dieser Spektren eine Aldehydgruppe nur beim Asperosid (A) ausschliessen. In Übereinstimmung damit war seine krist. Di-O-Acetylverbindung gegen CrO_3 in Eisessig weitgehend beständig. Über Versuche zur Konstitutionsermittlung der hier beschriebenen Stoffe wird in der folgenden Mitteilung berichtet²¹⁾.

Die KEDDE-negative Substanz U (= MKh6) zeigte im UV.-Spektrum (Fig. 10) nur ganz schwache Maxima bei 210 $m\mu$ ($\log \epsilon = 1,48$), 275 $m\mu$ ($\log \epsilon = 0,42$) und 321 $m\mu$ ($\log \epsilon = 0,12$)⁵¹⁾. Ihr IR.-Spektrum ist aus Fig. 11 ersichtlich. Die auffallend lang-

⁵¹⁾ Berechnet auf die Formel $C_{30}H_{50}O_9$ (554,7), die aber unsicher ist.

⁵²⁾ Die Substanzen α , β , A und B wurden von den Herren Dr. F. ZOLLER und R. ROTZLER in einem Unicam SP 500 Spektrophotometer mit Sekundär-elektronen-vervielfacher I P 28 gemessen. Alle anderen Substanzen wurden mit einem selbstregistrierenden UV.-Spektrophotometer, Beckman Modell DK2, von den Herren R. BÜHRER, A. SIEBER & K. STICH aufgenommen.

wellige Bande im CO-Gebiet (5,91) des IR.-Spektrums ist schwer mit dem fast leeren UV.-Spektrum in Einklang zu bringen.

Der eine von uns (M. Kh.) erhielt Stipendien von der SCHWEIZERISCHEN EIDGENOSSENSCHAFT IM RAHMEN DER BILATERALEN TECHNISCHEN HILFE und anschliessend von der VOLKART-STIFTUNG, Winterthur, die ihm die Ausführung dieser Arbeit in Basel ermöglichten, und für die er auch hier bestens danken möchte. Ferner danken wir der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, für grosszügige Beiträge an die Materialkosten und Herrn Dr. Ek. Weiss für seine Hilfe bei der Abfassung des Manuskripts.

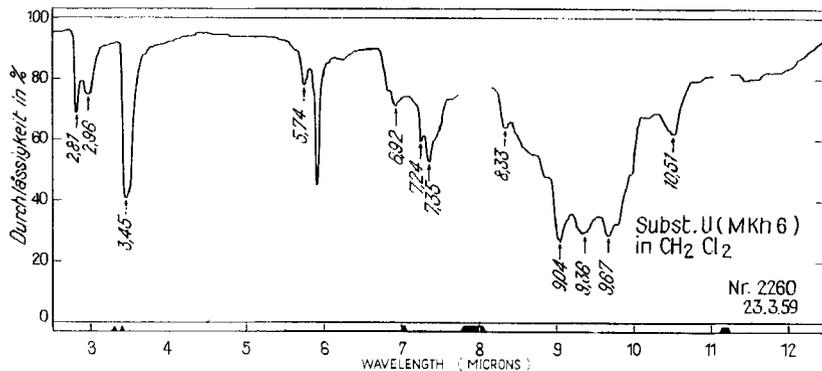


Fig. 11. IR.-Spektrum von Substanz U (M Kh 6) in CH_2Cl_2
 $c = 0,058 \text{ Mol/l}^{53}$) (ber. auf $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_9$), $d = 0,2 \text{ mm}$

Experimenteller Teil

Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Bestimmung der Drehung und zur Aufnahme der UV.- und IR.-Spektrums wurden 1 Std. bei 0,05 Torr und 60° getrocknet, zur Analyse 5 Std. bei 110° und 0,01 Torr über P_2O_5 . Bei freien Glykosiden erfolgte die Einwaage im Schweinchen. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chf-Ae-(1:3), Waschen mit 2N HCl, 2N Na_2CO_3 und W, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen. Ausführung der Adsorptionschromatographie⁵⁴) an alkalifreiem Al_2O_3 ⁵⁵) oder SiO_2 ⁵⁶) nach früheren Angaben. Es wurden die folgenden Abkürzungen benützt: AcOH = Eisessig, $(\text{Ac})_2\text{O}$ = Acetanhydrid, Ae = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Be = Benzol, Bu = n-Butanol, Chf = Chloroform, Fmd = Formamid, Me = Methanol, Mek = Methyl-äthyl-keton, ML = eingedampfte Mutterlauge, n. u. = nicht untersucht, Pchr = Papierchromatogramm und Papierchromatographie, Pe = Petroläther, Pgl = 1,2-Propylenglykol, Py = Pyridin, To = Toluol, W = Wasser.

Die Papierchromatogramme wurden auf WHATMAN-Nr.1-Papier ausgeführt. Zum Tränken mit Fmd wurde durch eine Lösung von 25% Fmd in An gezogen und ca. 10 Min. an der Luft trocknen gelassen. Zum Tränken mit W oder mit Pgl-W-(1:4) (Methode v. Euw) wurde das trockengewogene Papier durch eine Lösung von W-An-(1:2) bzw. durch Pgl-W-(1:4), das mit der 3-fachen Menge An verdünnt war, gezogen und nach kurzem Trocknen die Substanz aufgetragen. Dann noch so lange frei hängen gelassen bis das Papier genau 35% schwerer war als in trockenem Zustand. Die Rf-Werte sind dann recht gut reproduzierbar.

⁵³) Aufgenommen von den Herren R. BÜHRER & K. STICH mit einem PERKIN-ELMER double beam IR.-Spektrophotometer, Modell 21 mit NaCl-Prisma.

⁵⁴) T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Disc. Trans. Farad. Soc. 7, 305 (1949).

⁵⁵) «MERCK» standardisiert nach BROCKMANN.

⁵⁶) Silicagel engporig 0,15–0,30 mm, gekörnt für Chromatographie, bezogen von Dr. BENDER & Dr. HOBEIN AG, Zürich 42.

Extraktion. 6,5 kg Wurzelrinde Probe a wurden in der Schlagmühle zerkleinert und das Pulver je 2 mal mit je 10 l 50-, 60-, 75- und 95-proz. Alk bei 20° perkoliert. Dauer total 7 Tage. Eine Probe des letzten Perkolates wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand gab mit KEDDE-Reagens keine Violettfärbung mehr. Die vereinigten Auszüge wurden im Vakuum bei 50° auf ca. 3 l eingengt, mit demselben Volumen Alk vermischt, dann mit dem nach früherer Vorschrift¹²⁾ aus 4 kg Pb-Acetat-trihydrat bereiteten, gut gewaschenen und in 1 l Alk aufgeschlemmten Pb(OH)₂ versetzt und 15 Min. energisch geschüttelt. Dann wurde abgenutscht, mit 50-proz. Alk gut gewaschen, das klare Filtrat mit 2N H₂SO₄ auf pH = 6 gestellt und unter Erhaltung dieses pH im Vakuum auf 1 l eingengt. Das wässrige Konzentrat wurde 5mal mit je 1000 ml Ae, dann 5mal mit je 1000 ml Chf und zuletzt 5mal mit je 1000 ml Chf-Alk(2:1) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase war dann nicht mehr bitter und gab mit KEDDE-Reagens keine Violettfärbung. Sie wurde verworfen. Die Auszüge wurden der Reihe nach je zweimal mit 150 ml W, 150 ml 2N Na₂CO₃ und 150 ml W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Ausbeute und Kontrolle durch Papierchromatogramme vgl. Tabelle 1 und 2. In gleicher Weise wurde das weitere Material extrahiert.

Reinigung des rohen Ae-Extrakts. Die 17,09 g roher Ae-Extr. wurden in 300 ml 80-proz. Me gelöst und 3mal mit je 300 ml Pe ausgeschüttelt. Die Pe-Auszüge wurden im Gasstrom 2mal mit je 100 ml 80-proz. Me ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (12,88 g vorwiegend fettes Öl) gab mit KEDDE-Reagens keine Violettfärbung und wurde verworfen. Die vereinigten 80-proz. Me-Auszüge wurden im Vakuum von Me befreit und die wässrige Suspension 5mal mit je 300 ml Chf ausgeschüttelt. Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum gab 6,21 g gereinigten Ae-Extr.

Trennung des Ae-Extrakts. 6,4 g gereinigter Ae-Extr. (aus 6,72 kg Rinde, Probe a) wurden an 200 g SiO₂ chromatographiert (vgl. Tab. 6).

Tabelle 6. *Chromatographie von 6,4 g gereinigtem Ae-Extr. an 200 g SiO₂*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel je 650 ml pro Fraktion	Eindampfrückstand				Endprodukt bzw. weitere Verarbeitung
		roh		Krist. aus An-Ae		
		Menge in mg	KEDDE-R. bzw. Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	
1-6	Be-Chf-(20:80)	2120	—	—	—	verworfen
7-12	Chf	1600	±	—	—	n. u.
13	Chf-Me-(99:1)	64	±	—	—	n. u.
14-17	„ „ „	755	α (A)	—	—	Tab. 7
18-21	„ „ -(98:2)	806	A	309	195-202°	Krist. = Endpr.
22-23	„ „ „	140	A	31	218-220°	ML n. u.
24	„ „ „	22	(A)	—	—	nicht getrennt
25-27	„ „ -(96:4)	118	(α) (β) A	—	—	„ „
28-29	„ „ -(70:30)	353	—	—	—	verworfen

Hier wurden somit 340 mg krist. A erhalten. 672 mg der Fr. 14-17 wurden an 20 g Al₂O₃ chromatographiert (Tab. 7).

Isolierung der Substanzen α und β aus Fr. 1 von Tab. 7 durch präp. Papierchromatographie. 110 mg der Fr. 1 von Tab. 6 wurden auf 44 Papierblättern (WATHMAN Nr. 1, 19 cm breit) im System Be-Chf-(7:5)/Fmd chromatographiert. Nachdem die Lösungsmittelfront den untern Papierrand erreicht hatte, wurde im Dunkeln getrocknet und die Zonen auf 3 schmalen ausgeschnittenen Streifen mit KEDDE-Reagens lokalisiert. Es wurden nur die α- und β-Zonen ausgeschnitten. Diese wurden mit Me-W-(1:1), Me und Chf eluiert. Nach starkem Einengen im Vakuum wurde die wässrige Suspension mit Chf ausgeschüttelt. Die wie üblich gewaschenen und getrockneten Auszüge gaben: 33 mg Material aus α-Zonen und 30 mg Material aus β-Zonen.

Tabelle 7. *Chromatographie von 672 mg der Fr. 14-17 (Tab. 6) an 20 g Al₂O₃*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel je 70 ml pro Fraktion	Eindampfrückstand roh		
		Menge in mg	KEDDE-R. bzw. Flecke im Pchr	Weitere Verarbeitung
1	Chf	138	α, β (A)	präp. Pchr
2-6	„	186	α (β)	nicht untersucht
7-12	Chf-Me-(99:1)	138	(α)	„
13-16	„ „ -(98:2)	38	\pm	verworfen
17-18	„ „ -(94:6)	16	-	„

Die 33 mg rohes α -Material wurden an 990 mg SiO₂ chromatographiert (je 3,3 ml pro Fr.). Die mit Chf-Me-(99:1) eluierten Anteile (12 mg) gaben aus Me-Ae 10 mg farblose Nadeln, Smp. 160-170°.

Die 30 mg rohes β -Material wurde an 900 mg Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Be-Chf-(20:80) sowie Chf eluierten Anteile (4 mg) waren KEDDE-positiv. Sie zeigten im Pchr nur den β -Fleck, kristallisierten aber bisher nicht.

Trennung des Chf-Extrakts. Der Chf-Extrakt aus Probe a wurde in 2 Portionen an SiO₂ chromatographiert, entspr. Tab. 8 und 9.

Tabelle 8. *Chromatographie von 6 g Chf-Extr. aus Probe a (entspr. 3,19 kg Wurzelrinde von Probe a) an 180 g SiO₂*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel je 600 ml pro Fraktion	Eindampfrückstand			
		Menge in mg	KEDDE-R. bzw. Flecke im Pchr	Gruppe	Weitere Verarbeitung
1-5	Chf	608	-	-	
6-7	Chf-Me-(99:1)	43	-	-	
8-18	„ „ „	2030	α (A) B (C)	1	Tab. 10
19-20	„ „ -(98:2)	407	B	2	Tab. 12
21	„ „ „	160	B+2 kürzere	1	Tab. 10
22-24	„ „ „	94	B+2 kürzere	3	2286 mg zur Verteilungs- chromatographie
25-29	„ „ -(96:4)	857	(B)+3 kürzere	3	
30-33	„ „ -(92:8)	1084	3 kürzer als B	3	
34	„ „ -(70:30)	251	\pm	3	

Trennung von 50 mg Gruppe 1 (von Tab. 9) durch präp. Pchr. Dieses Material wurde wie oben auf 30 Papierplättchen im System Be-Chf-(7:5)/Fmd präparativ getrennt. Dauer 10 Std. Es wurde nur die Zone B ausgeschnitten und eluiert. Das wie oben von Fmd befreite Eluat (25 mg) wurde an SiO₂ chromatographiert. Die mit Chf-Me-(98:2) eluierten Anteile (20 mg) gaben aus Me-W 10 mg reine Subst. B in farblosen Nadeln, Smp. 151-157°, $[\alpha]_D^{25} = +22,7 \pm 3^\circ$ ($c = 0,6$ in Me). Nach Pchr identisch mit dem an Al₂O₃ chromatographierten Material (Tab. 10 und 11).

Trennung der Hauptmenge von Gruppe 1. Die Fr. 8-18 und 21 von Tab. 8 und die Fr. 9-22 von Tab. 9 wurden vereinigt (4,7 g). Davon wurden 4,6 g an 140 g Al₂O₃ chromatographiert (Tab. 10).

Die ML von Subst. U (Fr. 24-28) zeigten im Pchr (α), A und B; sie wurden nicht getrennt. Die Fr. 2-6 wurden zur Gewinnung von α an SiO₂ chromatographiert (Tab. 11).

Trennung der 147 mg Kristalle aus Fr. 18 von Tab. 11 durch präp. Pchr. Die 147 mg Kristalle wurden auf 50 Papierplättchen wie oben im System Be-Chf-(7:5)/Fmd getrennt. Dauer 2,5 Std.

Tabelle 9. *Chromatographie von 6,25 g Chf-Extr. aus Probe a (entspr. 3,30 kg Wurzelrinde von Probe a) an 190 g SiO₂*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel je 600 ml pro Fraktion	Eindampfrückstand			
		Menge in mg	KEDDE-R. bzw. Flecke im Pchr	Gruppe	Weitere Verarbeitung
1-4	Chf	380	—	—	50 mg für präp. Pchr Rest Tab. 10 2301 mg zur Verteilungs- chromatographie Tab. 13
5-8	Chf-Me-(99:1)	700	±	—	
9-19	„ „ „	2300	α (A) B	1	
20-22	„ „ -(98:2)	366	(A) B	1	
23-24	„ „ „	46	B (C) (D)	3	
25-29	„ „ -(96:4)	697	kurz laufend	3	
30-33	„ „ -(92:8)	1258	„ „	3	
34	„ „ -(70:30)	300	„ „	3	

Tabelle 10. *Chromatographie von 4,6 g Gruppe 1 aus Chf-Extr. an 140 g Al₂O₃*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel je 460 ml pro Fraktion	Eindampfrückstand					Endprodukt od. weitere Verarbeitung	
		roh		Kristalle				
		Menge in mg	KEDDE-R. oder Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	KEDDE-R. od. Flecke im Pchr		
1	Be-Chf-(1:1)	48	±	—	—	—	verworfen Tab. 11	
2-6	„ „ „	1340	α, B	—	—	—		
7-10	„ „ „	340	B	600	153-158°	B	Krist. = Endpr. ML nicht getrennt Tab. 13	
11-14	„ „ -(2:8)	275	B					
15-16	Chf	786	B					
17-18	„ „ „	97	B + kurze	—	—	—		Krist. = Endpr.
19-23	Chf-Me-(99:1)	536	A	250	198-204°	A		
24-27	„ „ -(98:2)	210	±	25	210-220°	—	Endpr. = Subst. U (MKh 6)	
28	„ „ -(96:4)	22	±					
29-30	„ „ „	23	(α) A, B	—	—	—	nicht getr. „ „	
31	„ „ -(85-15)	37	(α) A + 2 kurze	—	—	—		

Es wurden nur die α-Zonen ausgeschnitten und eluiert. Sie lieferten 80 mg wie oben von Fmd befreites Eluat. Dieses wurde mit 43 mg analogem Material aus der Trennung von Fr. 6 von Tab. 13 an SiO₂ chromatographiert (siehe unten).

Trennung von Gruppe 2. Die 407 mg Fr. 19-20 von Tab. 8 wurden an 12 g Al₂O₃ chromatographiert (Tab. 12).

Trennung der Gruppe 3 und weiterer amorpher Anteile durch Verteilungschromatographie. Es wurden vereinigt: 2286 mg Fr. 22-34 von Tab. 8, 2301 mg Fr. 23-34 von Tab. 9, 97 mg Fr. 17-18 von Tab. 10, 614 mg ML der Fr. 18-27 von Tab. 11 und die 119 mg Fr. 28-30 von Tab. 11. Dazu kamen 970 mg analoges Material aus 2 kg Droge enthaltend α, B, C, D, E, E', E'', E''', F, G, G' und H. Das Ganze wog nach Trocknung 5,857 g. Es wurde in 100 ml An gelöst, mit 100 g

Tabelle 11. *Chromatographie von 1340 mg Fr. 2-6 von Tab. 10 an 40 g SiO₂*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel je 135 ml pro Fraktion	Eindampfrückstand					Weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle			
		Menge in mg	KEDDE-R. od. Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	KEDDE-R. od. Flecke im Pchr	
1-3	Be-Chf-(75:25)	—	—	—	—	—	nicht getrennt Präp. Pchr ML zu Tab. 13 nicht getrennt ML zu Tab. 13 Verteilungsschr. Tab. 13
4-6	„ „ -(50:50)	—	—	—	—	—	
7-9	„ „ -(20:80)	—	—	—	—	—	
10-12	Chf	—	—	—	—	—	
13-16	Chf-Me-(99:1)	9	—	—	—	—	
17	„ „ -(98:2)	21	α, B	—	—	—	
18	„ „ „	217	α, B	147	153-175°	α, B	
19-27	„ „ „	939	(α), B	368	153-167°	(α), B	
28-30	„ „ -(96:4)	119	(α), B	—	—	—	
31-32	„ „ „	5	—	—	—	—	

Tabelle 12. *Chromatographie von Gruppe 2 (407 mg Fr. 19-20 von Tab. 8) an 12 g Al₂O₃*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel je 40 ml pro Fraktion	Eindampfrückstand					Weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle			
		Menge in mg	KEDDE-R. od. Flecke in Pchr	Menge in mg	Smp.	KEDDE-R. od. Flecke im Pchr	
1-4	Be-Chf-(1:1)	5	—	—	—	—	} Krist. = Endpr., ML nicht getr.
5	„ „ -(2:8)	31	±	170	152-160°	B	
6-10	„ „ „	117	B				
11-13	Chf	114	B				
14	„ „ „	8	B	2	155-165°	B	
15	Chf-Me-(99:1)	15	B	3	155-170°	B	
16	„ „ „	13	A, (B) + 1 kürzerer	7	200-206°	A(B)	nicht getrennt
17-19	„ „ „	25	A, (B) + 1 kürzerer	5	196-206°	A(B) + 1 kürzerer	„ „
20	„ „ -(97:3)	21	A, (B) + 1 kürzerer	—	—	—	„ „
21	„ „ „	7	A, (B) + 1 kürzerer	2	217-219°	A + 1 kürzerer	„ „
22	„ „ „	2	—	—	—	—	„ „

gereinigtem, trockenem Kieselgur³⁹⁾ und 100 g Pgl-W-(1:4) vermischt. Dann wurde das An im Vakuum entfernt und die homogene Masse auf eine Säule aus 1,5 kg gereinigtem Kieselgur mit 1,5 kg Pgl-W-(1:4) in Be-Chf-(1:1) gegeben und zuerst mit diesem Gemisch (gesättigt mit Pgl-W-(1:4)), von Fr. 51 an mit Be-Chf-(1:4) eluiert. Die Laufgeschwindigkeit betrug 70 ml/Std.

Temperatur 23–27°. Jede Fraktion betrug 430–450 ml. Jede Fr. wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 40 ml Chf aufgenommen, 2mal mit je 10 ml 10-proz. KHCO₃-Lösung und 2mal mit je 10 ml W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Über das Ergebnis orientiert Fig. 8 und Tab. 13.

Tabelle 13. Verteilungschromatographie von 5,857 g Gemisch (bez. Gruppe 3)

Fraktions-Nr.	Eindampfrückstand					Weitere Verarbeitung
	roh		Kristalle			
	Menge in mg	KEDDE-R. oder Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	KEDDE-R. oder Flecke im Pchr	
1–3	23,8	—	—	—	—	
4	7,5	±	—	—	—	
5	64	(α)	—	—	—	nicht getrennt
6	400	α (B)	—	—	—	Gr. I
7–8	440	(α) B	—	—	—	nicht getrennt
9–13	929	(B), C, D, E	—	—	—	Gr. II
14–17	364,5	C, D, E, E', E''	52	120–130°	C, D, E, E', E''	nicht getrennt
18–50	1492	(C) (D), E, E', E'', E''', F	78	260–300°	—	Gr. III
51–59	142	(E) (E') E'', E''', F (G)	—	—	—	nicht getrennt
60–65	92	F, G, G'	—	—	—	Gr. IV
66–69	38	(F) G, G', (H)	—	—	—	nicht getrennt
70–80	179	G, G', H	—	—	—	Gr. V
81–114	488	(G) H	—	—	—	nicht getrennt

a) *Trennung der Gruppe I.* 360 mg der Fr. 6 von Tab. 13 wurden auf 90 Papierblättern im System Be-Chf-(7:5)/Fmd präparativ getrennt. Dauer 2½ Std. Es wurden nur die α-Zonen eluiert. Reinigung wie oben (bei α aus Ae-Extr.) gab 43 mg gereinigtes α-Eluat. Es wurde zusammen mit den 80 mg analogem Material aus Fr. 18 von Tab. 11 an 3,3 g SiO₂ chromatographiert. Die mit Chf-Me-(99:1) eluierten Anteile (88 mg) gaben aus Me-Ae 69 mg Subst. α in farblosen Kristallen, Smp. 174–178°.

b) *Trennung der Gruppe II.* 300 mg der Fr. 9–13 von Tab. 13 wurden auf 75 Papierblättern im System Be-Chf-(1:1)/Pgl-W-(1:4) präparativ getrennt. Dauer 3½ Std. Es wurden die Zonen C, D und E ausgeschnitten und die rohen Eluate wie oben gereinigt.

Das C-Eluat (57 mg) gab nach Chromatographie an 1,8 g SiO₂ 47 mg KEDDE-positives Material, das im Pchr nur den C-Fleck zeigte. Kristallisation aus Me-Ae lieferte 1,5 mg farblose Körner, Smp. 222–228°. Das D-Eluat (54 mg) wurde an 1,5 g Al₂O₃ chromatographiert und lieferte 14,5 mg KEDDE-positives Material. Aus An-Ae 8 mg farblose Nadeln oder rechteckige Plättchen. Smp. 250–255°. Das E-Eluat (7 mg) wurde nicht weiter gereinigt.

c) *Trennung der Gruppe III.* Dies Material (Fr. 18–50 von Tab. 13) gab aus An zuerst 78 mg farbloses krist. Pulver, Smp. 260–300°, KEDDE-negativ, nicht untersucht. Von der ML wurden 1,00 g mit 490 mg Reagens T⁴⁰) in 20 ml Me gelöst, mit 0,85 ml AcOH versetzt und 20 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde mit 50 ml W versetzt und 4mal mit je 100 ml Chf-Alk-(4:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit 10 ml W, 25 ml 2N-Sodalösung und 25 ml 10-proz. Na₂SO₄-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand, 850 mg, (Teil a) zeigte im Pchr die Flecke (C), (D), E, E', E'' und F. (Verarbeitung siehe unten.)

Die wässrige Phase und das erste Waschwasser wurden mit 9 ml konz. HCl versetzt und 24 Std. mit 200 ml Chf geschüttelt. Die Chf-Lösung wurde mit je 25 ml 10-proz. Na₂SO₄-Lösung, 2N-Sodalösung und 10-proz. Na₂SO₄-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Die saure, wässrige Phase wurde erneut mit 200 ml Chf geschüttelt und diese Behandlung noch 2mal wiederholt. An Chf-Auszügen resultierten:

nach 24 Std.	68 mg
„ 48 „	weitere 12 mg
„ 120 „	14 mg
„ 144 „	5 mg
	<u>Total 99 mg</u> Teil b (Aldehyde).

Im Pchr E'', E''', mit etwas E' und F. Dieses Material konnte noch nicht getrennt werden. Die obigen «aldehyd-freien» Anteile (850 mg) wurden nochmals analog mit 450 mg Reagens T behandelt und lieferten wie oben 807 mg Teil a (aldehydfrei), im Pchr (C) (D) E, E', E'' und F sowie 23,5 mg «Aldehyd» (Teil b).

Von den 807 mg Teil a wurden 200 mg auf 60 Papierblättern im System Be-Chf-(1:1)/Pgl-W-(1:4) präparativ zerlegt. Dauer 6 Std. Eluiert und wie oben gereinigt wurde das Material der Zonen E und E' gemeinsam (28 mg), E'' (28 mg enthielt noch Spuren E') und F (104 mg). Die zwei erstgenannten wurden nicht weiter gereinigt. Das F-Eluat (104 mg) wurde an 3 g SiO₂ chromatographiert. Die mit Chf-Me-(98:2) bis -(96:4) eluierten Anteile (84,5 mg) gaben aus An-Ae 17 mg krist. Subst. F, Smp. 175–182°.

d) *Trennung der Gruppe IV*. Die 92 mg Fr. 60–65 von Tab. 13 wurden auf 35 Papierblättern im System Be-Chf-(1:1)/Pgl-W-(1:4) getrennt, Dauer 14 Std. Eluiert und wie oben gereinigt wurden die drei Zonen F, G und G'. Das F-Eluat (20 mg) lieferte nach Chromatographie an Al₂O₃ 14 mg KEDDE-positives Material, das nur den F-Fleck zeigte, aber auch nach Impfen mit F-Kristallen nicht kristallisierte. Das G-Eluat (20 mg) gab analog 13 mg amorphes G-Konzentrat, das nur den G-Fleck zeigte. Das G'-Eluat (19 mg) zeigte im Pchr neben G' noch schwach den G-Fleck. Nach Chromatographie an Al₂O₃ wurden daraus 7 mg amorphes G'-Konzentrat erhalten, das nur den G'-Fleck zeigte.

e) *Trennung der Gruppe V*. Die 179 mg Fr. 70–80 von Tab. 13 wurden auf 80 Papierblättern wie Gruppe IV getrennt, Dauer 16 Std. Nach Reinigung wie oben resultierten 25 mg G-Eluat, 32 mg G'-Eluat und 90 mg H-Eluat. Alle drei wurden durch Chromatographie an Al₂O₃ gereinigt. An KEDDE-positivem Material resultierten 10 mg G, 17 mg G' und 52 mg H-Konzentrat. Keines der Präparate kristallisierte. Alle drei waren nach Pchr einheitlich.

Fermentativer Abbau des Chf-Alk-(2:1)-Extr. 50 mg Chf-Alk-(2:1)-Extr. wurden in 1 ml W gelöst, mit der trüben Lösung von 100 mg Pilzamylyase⁴²) in 2 ml W, dann mit 0,2 ml To versetzt und verschlossen 7 Tage bei 33° stehengelassen. Dann wurden 15 ml Alk zugegeben und die Fällung durch ein mit Kieselgur gedichtetes Filter abgenutscht und mit Alk gewaschen. Das klare Filtrat wurde im Vakuum vom Alk befreit und die wässrige Lösung 4mal mit je 10 ml Chf, dann 4mal mit je 10 ml Chf-Alk-(2:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden der Reihe nach mit je 5 ml W, 2N Sodalösung und W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten 10 mg Chf-Extr. und 25 mg Chf-Alk-(2:1)-Extr. Letzterer wurde nochmals analog, aber 4 Wochen fermentiert. Es resultierten hierauf noch 5 mg Chf-Extr. und 15 mg Chf-Alk-Extr. Die Prüfung im Pchr ergab das folgende Bild:

Erster Chf-Extr. (10 mg)	enthielt D, E''', G, G' und H.
Zweiter „ „ (5 mg)	„ „ „ „ „ „ „ „
Chf-Alk-(2:1)-Extr. (15 mg)	„ J, K, L, (M) und (N)

Beschreibung der isolierten Stoffe. – UV.-Spektren und Farbreaktionen vgl. theoret. Teil.

Subst. α = Kamalosid. Aus Me-Ae farblose flache Stäbchen, Smp. 174–178°. $[\alpha]_D^{25} = +10,6 \pm 3^\circ$ ($c = 0,63$ in Me).

C ₃₁ H ₄₈ O ₉	Ber. C 65,93	H 8,56	Zwei -OCH ₃ 10,99%
(564,69)	Gef. „ 65,29; 64,90	„ 8,70; 8,60	„ 14,35%

Biolog. Prüfung vgl. theor. Teil.

Substanz β. Dieser Stoff wurde bisher nur durch sein Verhalten im Pchr und sein UV.-Spektrum charakterisiert. Nach letzterem dürfte das Präparat aber nur ca. 50% Butenolid und ca. 50% Ballaststoffe enthalten haben.

Subst. A = Asperosid. Aus An-Ae farblose flache Stäbchen, Smp. 198–205°, $[\alpha]_D^{25} = -19,5 \pm 2^\circ$ ($c = 0,98$ in Me).

C ₃₁ H ₄₈ O ₉	Ber. C 65,93	H 8,56	Zwei -OCH ₃ 10,99%
(564,69)	Gef. „ 65,92	„ 8,59	„ 11,52%

Di-O-acetyl-asperosid. 27 mg Asperosid vom Smp. 198–205° wurden in 0,5 ml abs. Py und 0,4 ml (Ac)₂O 48 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 30 mg neutrales Rohprodukt. Aus An-Ae 23 mg farblose zu Drusen verwachsene Mikrokristalle, Smp. 159–161°. Nach Umkristallisieren Smp. 161–162°, $[\alpha]_D^{25} = -22,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$ in Chf).

$C_{35}H_{52}O_{11}$	Ber. C 64,79	H 8,08	Zwei OCH ₃	9,56%
(648,77)	Gef. „ 64,78	„ 8,27	„	9,88%

Prüfung von Di-O-acetyl-asperosid auf Beständigkeit gegen CrO₃. 20 mg Substanz vom Smp. 159–161° wurden in 0,5 ml reinstem AcOH gelöst, mit 0,14 ml 2-proz. CrO₃-AcOH-Lösung versetzt und 2 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde 0,1 ml Me zugegeben und noch 12 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 20 mg neutrales Rohprodukt. Aus An-Ae 18 mg Kristalle, Smp. 160–162°, $[\alpha]_D^{25} = -19,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$ in Chf). Nach Misch-Smp. und Pchr identisch mit Ausgangsmaterial.

Substanz B = Streblosid. Dieses Glykosid kristallisierte bisher nicht aus Me-Ae oder An-Ae, aber aus Me-W oder An-W in farblosen Nadeln vom Smp. 153–158°, $[\alpha]_D^{29} = +25,3^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,88$ in Me). Gewichtsverlust bei Trocknung 3,2%.

$C_{31}H_{46}O_{10}$	Ber. C 64,34	H 8,01	Zwei -OCH ₃	10,73%
(578,68)	Gef. „ 63,84; 63,59	„ 7,97; 8,23	„	11,06%

Biolog. Prüfung vgl. Theoret. Teil.

O-Acetyl-streblosid. 27 mg Streblosid vom Smp. 153–158° wurden in 0,5 ml abs. Py und 0,4 ml (Ac)₂O 48 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 30 mg neutrales Rohprodukt, das bisher nicht kristallisierte.

O-Benzoyl-streblosid. 25 mg Streblosid vom Smp. 153–158° wurden in 0,5 ml abs. Py gelöst, bei 0° mit 0,17 ml Benzoylchlorid versetzt und unter H₂O-Ausschluss 2 Std. bei 0° dann 16 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde mit 0,4 ml Me versetzt und weitere 2 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 138 mg neutrales Rohprodukt, das stark nach Benzoesäure-methylester roch. Es wurde an 4,2 g Al₂O₃ chromatographiert, lieferte aber bisher keine Kristalle.

Substanz C = Indrosid. Aus Me-Ae farblose Körner, Smp. 222–228°. Da nur 1,5 mg vorlagen, musste die Drehung an einem amorphen Präparat bestimmt werden, $[\alpha]_D^{26} = +18,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,92$ in Me).

Substanz D = Lucknosid. Aus An-Ae farblose Plättchen, Smp. 253–259°, $[\alpha]_D^{25} = -4,0^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,55$ in Me).

Substanz F. Aus An-Ae farblose Kugeldrusen, Smp. 175–182°, $[\alpha]_D^{24} = -12,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,89$ in Me).

$C_{31}H_{46}O_{10}$ (580,69)	Ber. C 64,11	H 8,33%	Gef. C 64,52	H 8,51%
-------------------------------	--------------	---------	--------------	---------

Substanz G. Der Stoff lag nur als amorphes Konzentrat vor, $[\alpha]_D^{26} = -1,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,88$ in Me).

Substanz G'. Der Stoff lag nur als amorphes Konzentrat vor, das im Pchr noch schwach den wenig schneller laufenden G-Fleck zeigte. $[\alpha]_D^{23} = -12,5^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,62$ in Me).

Substanz H. Der Stoff lag ebenfalls nur als amorphes Konzentrat vor, das aber im Pchr nur den H-Fleck zeigte. $[\alpha]_D^{26} = -15,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,97$ in Me).

Substanz U = Pröp. M Kh 6. Umkristallisieren aus An-Ae gab farblose Nadeln, Smp. 210–220°, $[\alpha]_D^{25} = -1,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,99$ in Me).

$C_{27}H_{44}O_8$ (496,63)	Ber. C 65,30	H 8,93	O 25,77	-OCH ₃ 6,26%
$C_{30}H_{50}O_9$ (554,70)	„ „ 64,95	„ 9,09	„ 25,96	„ 5,60%
	Gef. „ 64,92	„ 9,03	„ 24,78	„ 6,73%

UV.- und IR.-Spektren vgl. Theoret. Teil. Der Stoff gab weder mit SbCl₃ noch mit Zimt-aldehyd-H₃PO₄-HClO₄⁵⁷) eine Färbung.

Hydrolyse von Substanz U. 5 mg Subst. wurden mit 0,2 ml KILIANI-Mischung⁵⁸) 1 Std. auf 100° erhitzt. Dann wurde mit 0,1 ml W versetzt und bei 0,01 Torr bei 20° eingedampft. Der Rückstand wurde nochmals mit 0,1 ml W versetzt und im Vakuum eingedampft. Dann wurde wieder

⁵⁷) C. SANNIÉ, H. LAPIN, F. ELOY & L. C. SANCHEZ, Bull. Soc. chim. biol. 39, 301 (1957).

⁵⁸) H. KILIANI, Ber. deutsch. chem. Ges. 63, 2866 (1930).

mit 0,1 ml W versetzt und 4mal mit je 0,2 ml Chf ausgeschüttelt. Die Chf-Auszüge wurden mit wenig W gewaschen. Die vereinigten wässrigen Lösungen wurden durch Schütteln mit etwas Ag_2CO_3 von Cl-Ionen befreit. Nach Filtration wurde bei 0° kurz mit H_2S behandelt und die filtrierte Lösung im Vakuum eingedampft. Der Rückstand zeigte im Pehr in den Systemen Bu/W (36 Std.) sowie Bu-Mek/Borat-Puffer⁵⁹⁾, Entwicklung mit Anilin-phthalat, nur einen Fleck mit Laufstrecken genau wie 3-O-Methyl-D-glucose.

Die Mikroanalysen wurden unter der Leitung von Herrn E. THOMMEN im Mikrolabor unseres Instituts ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wurzelrinde von *Strebilus asper* LOUR. enthält ein Gemisch von teilweise isomeren, schwer trennbaren Cardenolid-Glykosiden. Aus den weniger stark wasserlöslichen Anteilen (Ae- und Chf-Extrakte) konnten 10 dieser Stoffe in papierchromatographisch reiner Form, davon 6 in Kristallen isoliert werden. Ausserdem liessen sich kleine Mengen von 4 weiteren Stoffen (E, E', E'' und E''') nachweisen, die weitgehend angereichert aber nicht rein erhalten wurden. Daneben wurde ein KEDDE-negatives Glykosid (U) krist. isoliert, dessen Zucker nach Papierchromatogramm vermutlich 3-O-Methyl-glucose ist.

Die stark wasserlöslichen Anteile enthielten nach Papierchromatogramm noch mindestens 5 Glykoside (J, K, L, M, N) von denen sich zwei (M und N) mit einer Glucosidase aus *Aspergillus oryzae* abbauen liessen.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

⁵⁹⁾ M. T. KRAUSS, H. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, J. Chromatogr. 3, 63 (1960).

178. Die Glykoside von *Strebilus asper* LOUR. 2. Mitteilung¹⁾

Glykoside und Aglykone 238. Mitteilung²⁾

von M. P. Khare, O. Schindler und T. Reichstein

(1. VI. 62)

In vorstehender Mitteilung²⁾ wurde über die Isolierung von 10 Cardenolid-Glykosiden aus der Wurzelrinde von *Strebilus asper* (*Moraceae*) berichtet, von denen 6 in Kristallen erhalten wurden. Wir beschreiben hier die Konstitutionsermittlung von dreien dieser Stoffe (α = Kamalosid, A = Asperosid und B = Streblosid) sowie Vorversuche, die einen gewissen Einblick in den Bau der übrigen ermöglichen. Grundlage war die hydrolytische Spaltung. – Alle 10 Cardenolide gehören zur Gruppe der schwer hydrolysierbaren Glykoside (mit Sauerstoff an C-2 des Zuckeranteils). Bei dieser Stoffgruppe gelingt die Gewinnung intakter Genine meistens³⁾ nur mit HCl in Aceton

¹⁾ Auszug aus Diss. M. P. KHARE, Basel 1959.

²⁾ 237. Mitteilung: M. P. KHARE, S. S. BHATNAGAR, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. 45, 1515 (1962).

³⁾ Nur in Fällen, in denen ein Genin vorliegt, das gegen Säure besonders stabil ist, waren auch andere Methoden brauchbar, so z. B. bei Sarverogeninderivaten, vgl. D. A. H. TAYLOR, Chemistry & Ind. 1953, 62, und teilweise auch bei Tanghinigenin-Derivaten, vgl. H. P. SIGG, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. 38, 166 (1955).