

*C. tombuctuensis*, *Stapelia gigantea*, *Sphaerocodon melananthum*, *Gongronema angolense* und *G. taylorii*, *Ceropegia bulbosa* (wobei vielleicht auch Alkaloide anwesend sind), *Dregea sinensis*, *D. abyssinica*, *D. macrantha*, *Fockea multiflora*.

Für den sicheren Nachweis, dass wirklich C-Nor-D-homo-steroiden vorliegen, ist aber vorläufig noch die präparative Isolierung, Abbau zu krist. Geninen und Nachweis des C-Nor-D-homo-pregnan-Gerüsts unerlässlich<sup>131)</sup>. Bei den festgestellten Glykosiden könnte es sich auch um Derivate von anderen Geninen handeln.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die chemischen Resultate in den meisten Fällen innerhalb der Gattungen gut übereinstimmen. Unterschiede wurden aber in folgenden Gattungen gefunden: *Cryptolepis*, *Periploca*, *Parquetina*, *Schizoglossum*, *Pachycarpus*, *Asclepias* (*sensu lato*) und *Gongronema*. Es ist aber zu berücksichtigen, dass es sich teilweise um kritische und teilweise um noch nicht revidierte Arten handelt, die später vielleicht in andere Gattungen versetzt werden. – Ein genereller Vergleich der Inhaltsstoffe zur Stellung der Gattungen im System schien uns verfrüht, auch wenn gewisse Züge aus Tab. 2 zu entnehmen sind.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS für die Unterstützung dieser Arbeit, sowie allen Herren und Firmen<sup>14)</sup>, die uns bei der Beschaffung, Identifizierung und Benennung der analysierten Pflanzen geholfen haben. Ferner danken wir dem BUNDESAMT FÜR INDUSTRIE, GEWERBE UND ARBEIT für Beiträge zur Beschaffung des Pflanzenmaterials aus Mitteln des ARBEITSBESCHAFFUNGSKREDITS DES BUNDES ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG.

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

<sup>131)</sup> Ob die verschiedenen unter den Namen Kondurangin und Vincetoxin bisher isolierten amorphen Präparate<sup>101)</sup> <sup>113)</sup> jeweils gleiche Stoffe enthalten, ist unsicher.

## 248. Kristallisiertes Acovenosid C

Glykoside und Aglykone, 240. Mitteilung<sup>1)</sup>

von P. Hauschild-Rogat, J. v. Euw, O. Schindler, Ek. Weiss und T. Reichstein

(23. VIII. 62)

Aus den Samen von *Acokanthera oppositifolia* (LAM.) CODD<sup>2)</sup> (= *A. venenata* G. DON) wurde früher das krist. O-Acetylderivat eines Triglykosids isoliert, das als Acovenosid-C-acetat bezeichnet wurde<sup>3)</sup>. Verseifung mit  $\text{KHCO}_3$  in Methanol<sup>4)</sup> gab ein amorphes oder undeutlich kristallines, biologisch stark wirksames Präparat Acovenosid C, das beim enzymatischen Abbau mit Strophanthobiase 2 Mol. D-Glucose und krist. Acovenosid A (VI) lieferte.

Bei einer vor ca. 3 Jahren durchgeführten Kontrolle zeigte sich, dass eine Probe des alten Präparates Acovenosid C deutlich Kristalle gebildet hatte. Durch Um-

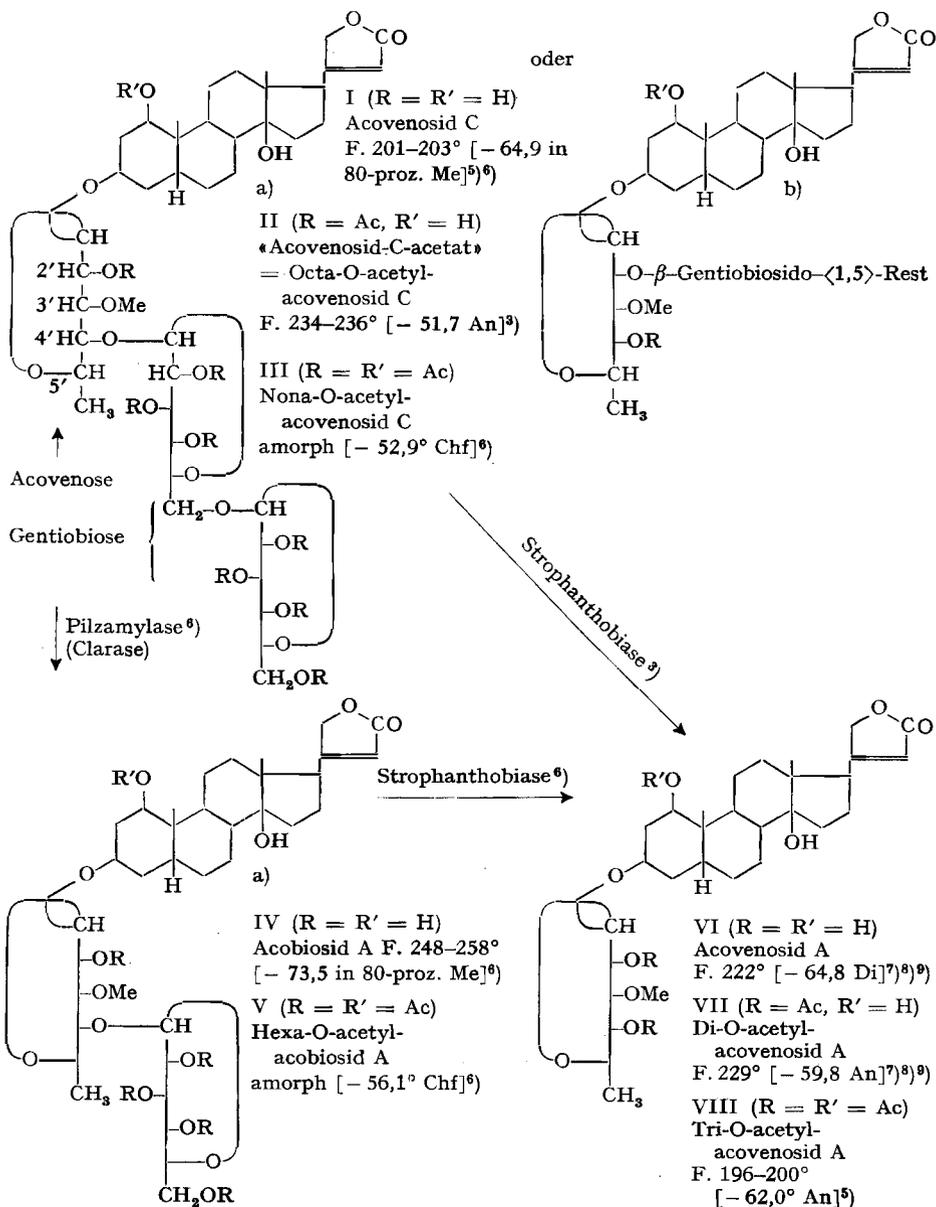
<sup>1)</sup> 239. Mitteilung: EVA ABISCH & T. REICHSTEIN, *Helv.* **45**, 2090 (1962).

<sup>2)</sup> L. E. CODD, *Bothalia*, VII part 3, 447–450 (Pretoria 1961).

<sup>3)</sup> K. MOHR & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 1239 (1951).

<sup>4)</sup> T. REICHSTEIN & J. v. EUW, *Helv.* **27**, 1181 (1938); H. ROSENMUND & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.* **17**, 176 (1942).

<sup>5)</sup> P. HAUSCHILD-ROGAT, Diss. Basel 1962 und spätere Publikation.



Für I–V kommen die Formeln entsprechend a) oder b) in Betracht. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die spez. Drehung für Na-Licht in den vermerkten Lösungsmitteln an: An = Aceton, Chf = Chloroform, Di = Dioxan, Me = Methanol.

<sup>6)</sup> Exper. Teil dieser Arbeit.

<sup>7)</sup> D. P. VELDSMAN, J. South African veterin. Med. Assoc. 20, 45 (1949); South African ind. Chemist 1949, 144, 172, 217.

<sup>8)</sup> J. v. EUW & T. REICHSTEIN, Helv. 33, 485 (1950).

<sup>9)</sup> W. SCHLEGEL, CH. THAMM & T. REICHSTEIN, Helv. 38, 1013 (1955).

kristallisieren und Impfen liess sich hierauf die Hauptmenge ebenfalls leicht kristallisieren. Der Stoff liess sich in zwei kristallisomeren Formen erhalten. Die hochschmelzende Form war identisch mit einem kürzlich erhaltenen Präparat (PHa 13), das aus dem Gemisch der Samenglykoside direkt durch Verteilungschromatographie (also nicht via O-Acetylverbindung) gewonnen worden war<sup>5)</sup>. Die Analyse passte auf die Formel  $C_{42}H_{66}O_{19}$  und im IR.-Spektrum war bei ca.  $8,1 \mu$  keine Acetylbande erkennbar. Die Struktur konnte wie folgt auf die zwei Möglichkeiten Ia und Ib eingeschränkt werden.

Da der Bau und die Konfiguration des Acovenosids A (VI) und seines Di-O-acetyl-Derivats VII bewiesen sind<sup>9)</sup>, war zur Abklärung der Struktur des Acovenosids C nur noch die Stellung der zwei Glucoseresste zu ermitteln. Wir fanden, dass «Acovenosid-C-acetat» (II) bei der Acetolyse mit  $ZnCl_2$  in Acetanhydrid<sup>10)</sup> in guter Ausbeute (45% d. Th.) krist. Octa-O-acetyl- $\alpha$ -gentiobiose<sup>11)</sup> liefert. Die zwei D-Glucoseresste liegen somit als Gentiobiosidorest vor, auf Grund der Drehung in  $\beta$ -D-glucosidischer Bindung. Aus folgendem Grund glauben wir, dass sie mit der Hydroxylgruppe am C-2' oder C-4' des Acovenosidrestes verknüpft sind, wie es in den Formeln Ia oder Ib zum Ausdruck gebracht ist. Acovenosid C liefert bei der Acetylierung mit Pyridin-Acetanhydrid bei 32° nach 16 Std. in guter Ausbeute das krist. «Acovenosid-C-acetat» (II)<sup>3)</sup>, das noch eine freie sekundäre HO-Gruppe enthält. Erst durch energische Acetylierung<sup>12)</sup> wurde das voll acetylierte Nona-O-acetyl-acovenosid C (III) erhalten, das bisher nicht kristallisierte, aber nach Papierchromatogramm (Fig. 2) rein war. Im IR.-Spektrum zeigte es (in  $CH_2Cl_2$ ) noch eine HO-Bande, die der tertiären HO-Gruppe entspricht. Dieses Verhalten ist typisch für 1  $\beta$ -Hydroxy-cardenolidglykoside<sup>9)</sup><sup>13)</sup>. Wir glauben daher, dass die 1-ständige HO-Gruppe im Acovenosid C frei ist. Daher kommen für den Stoff wie erwähnt nur die Formeln Ia und Ib in Frage.

Tab. 1. *Toxicität von krist. Acovenosid C und Acovenosid A bei intravenöser Infusion, ausgeführt an je 10 Tieren*

Stoff	Geometrisches Mittel der letalen Dosis
krist. Acovenosid C (I)	0,2214 $\pm$ 0,0140 mg/kg
amorphes Acovenosid C	0,2471 $\pm$ 0,0160 mg/kg <sup>3)</sup>
krist. Acobiosid A (IV)	0,1535 $\pm$ 0,0039 mg/kg
krist. Acovenosid A (VI)	0,2357 $\pm$ 0,0160 mg/kg <sup>8)</sup>

<sup>10)</sup> C. S. HUDSON & J. M. JOHNSON, J. Amer. chem. Soc. 39, 1272 (1917).

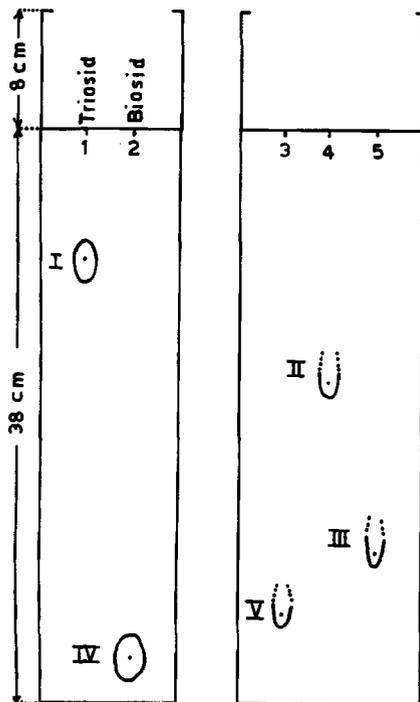
<sup>11)</sup> R. TSCHESCHE, Ber. deutsch. chem. Ges. 69, 2368 (1936), erhielt denselben Stoff aus Thevetin und A. RHEINER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, Helv. 35, 687 (1952), isolierten ihn aus Odorotriosid G.

<sup>12)</sup> Genau wie beim Ouabain und beim Acolongiflorosid K gelingt die vollständige Acetylierung auch hier bei ca. 14tägigem Erwärmen mit Acetanhydrid-Pyridin auf 37°, vgl. Helv. 45, 1244 (1962).

<sup>13)</sup> Besonders genau untersucht beim Ouabagenin und seinen Derivaten, vgl. CH. TAMM, Helv. 38, 147 (1955), und frühere Lit. daselbst, sowie Konstitution bei CH. THAMM, G. VOLPP & G. BAUMGARTNER, Helv. 40, 1469 (1957).

Mit «Clarase»<sup>14)</sup>, einem Fermentpräparat aus *Aspergillus oryzae*, lässt sich aus Acovenosid C ein Mol. D-Glucose abspalten. Es entsteht das krist. Acobiosid A (IV), dessen Hexa-O-acetyl-Derivat (V) bisher nicht kristallisierte. Mit Strophanthobiase liess sich IV erwartungsgemäss in Acovenosid A (VI) überführen.

Die Herren Dr. CHEN und Dr. HENDERSON hatten die Freundlichkeit, das krist. Acovenosid C sowie Acobiosid A biologisch an der Katze zu prüfen (Tab. 1)<sup>15)</sup>.



Papierchromatogramme

Fig. 1	Fig. 2
To-Bu-(1:1)/	Be-Chf-(10:1)/
Wasser	Fmd
18 $\frac{1}{2}$ Std.	4 Std.

Fig. 1 und 2 sind Papierchromatogramme, absteigend, Ausführung nach früheren Angaben<sup>16)</sup>. Beladung des Papiers mit 35% seines Gewichts an ruhender Phase.

- 1 = ca. 0,03 mg Acovenosid C (I)
- 2 = ca. 0,03 mg Acobiosid A (IV)
- 3 = ca. 0,03 mg Hexa-O-acetyl-acobiosid A (V)
- 4 = ca. 0,03 mg Octa-O-acetyl-acovenosid C (II)
- 5 = ca. 0,03 mg Nona-O-acetyl-acovenosid C (III)

Das krist. Acovenosid C war nur wenig wirksamer als das alte amorphe Präparat (der Unterschied ist nicht signifikant). Das Biosid IV ist merklich stärker wirksam als das Monosid VI und das Triosid I.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für einen Beitrag zu den Kosten dieser Arbeit.

<sup>14)</sup> Produkt der SCHWEIZERISCHEN FERMENT AG., Basel.

<sup>15)</sup> Wir danken den Herren Dr. K. K. CHEN und Dr. F. G. HENDERSON, LILLY RESEARCH LABORATORIES, Indiana, U.S.A., auch hier bestens für die Überlassung ihrer Resultate. Die Zahlen sind auch in einem von ihnen publizierten Übersichtsreferat enthalten (Festschrift für Prof. C. HEYMAN).

<sup>16)</sup> a) O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv. 34*, 108 (1951); b) E. SCHENKER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv. 37*, 680 (1954).

## Experimenteller Teil

*Krist. Acovenosid C. - a. Tief schmelzende Form.* Vom alten Präparat hatte eine kleine Probe Kristalle angesetzt; ein Teil wurde zum Impfen entnommen. Die ganze sonst vorhandene Menge (520 mg) wurde in 1,5 ml Wasser gelöst und mit Aceton bis zur beginnenden Trübung versetzt. Beim Impfen setzte Kristallisation ein; sie wurde durch allmählichen Zusatz von Aceton möglichst vervollständigt. Ausbeute 360 mg, Smp. 190–192° (zähflüssig),  $[\alpha]_D^{21} = -60,3^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,1$  in Methanol). Das Präparat war in Wasser und in Methanol sehr leicht löslich. Zur Analyse wurde 14 Std. bei 0,01 Torr und 100° über  $P_2O_5$  getrocknet und im Schweinchen eingewogen.

$C_{42}H_{66}O_{19}$  (874,95) Ber.  $C$  57,65 H 7,60% Gef.  $C$  57,74 H 7,75%

b) *Hoch schmelzende Form.* 190 mg der tief schmelzenden Form wurden in 3 ml Methanol gelöst. Beim Kochen begann die Abscheidung feiner Kristalldrusen, die nach halbstündigem Stehen vollständig war. Ausbeute 115 mg; die Mutterlauge gab nach Eindampfen und Trocknen nochmals 16 mg. Zur Reinigung wurde in 3 ml 80-proz. Methanol gelöst und die filtrierte Lösung im Vakuum eingedampft. Der Rückstand gab aus Methanol beim Kochen das Analysenpräparat. Smp. 201–203°,  $[\alpha]_D^{25} = -64,9^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,809$  in 80-proz. Methanol). Die Kristalle waren auch beim Kochen sehr schwer löslich in Methanol, leicht löslich in Wasser und wässrigem Alkohol oder Methanol. Die Wasser-Aceton-Mutterlaugen, aus denen sich die tiefschmelzende Form abgeschieden hatte, wurden im Vakuum eingedampft und der Rückstand gut getrocknet (220 mg). Er gab aus Methanol nach Aufkochen und Impfen nochmals 90 mg der hoch schmelzenden Form. – Eine weitere Menge altes amorphes Acovenosid C (1,2 g) gab aus 10 ml Methanol heiss nach Impfen direkt 960 mg Kristalle, Smp. 200–202°.

*Nona-O-acetyl-acovenosid C (III).* 500 mg krist. Octa-O-acetyl-acovenosid C (II) vom Smp. 234–236° wurden mit 5 ml abs. Pyridin und 4 ml Acetanhydrid auf 37° erwärmt. Bei der papierchromatographischen Kontrolle zeigte sich ein zunehmend stärkerer Fleck, der rascher lief, entspr. III (Fig. 2). Nach 14 Tagen war nur noch dieser sichtbar und der ursprüngliche Fleck II verschwunden. Die übliche Aufarbeitung gab 556 mg neutrales Rohprodukt als hellbraunes Harz. Es wurde an 25 g Kieselgel<sup>18)</sup> chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol-(99:1) eluierten Anteile gaben 551 mg farblosen Schaum, der bisher nicht kristallisierte.  $[\alpha]_D^{27} = -52,9^\circ \pm 2^\circ$  in Chf. Das Präparat gab im Papierchromatogramm (Fig. 2) nur einen Fleck. Im IR.-Spektrum in  $CH_2Cl_2$  war bei 2,78  $\mu$  eine OH-Bande sichtbar.

*Octa-O-acetyl- $\alpha$ -gentiobiase aus Octa-O-acetyl-acovenosid C (II).* 1 g Octa-O-acetyl-acovenosid C (II) vom Smp. 234–236° wurde mit 0,25 g frisch geschmolzenem  $ZnCl_2$  und 18 ml Acetanhydrid 30 Min. auf 100° erhitzt. Nach Abkühlen wurde auf 100 g Eis gegossen und 18 Std. bei 20° stengelassen. Dann wurde bei 0° mit fester Soda nicht ganz neutralisiert und 3mal mit je 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die mit Wasser, Sodalösung und Wasser gewaschenen und über  $Na_2SO_4$  getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 1,075 g neutrales Rohprodukt als hellbraunes Glas. Aus Benzol-Petroläther kristallisierten 243 mg Octa-O-acetyl- $\alpha$ -gentiobiase in farblosen Nadeln, Smp. 185–189°. Die eingedampfte Mutterlauge (830 mg) wurde an 30 g Kieselgel<sup>18)</sup> chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol-(99:1) eluierten Anteile 573 mg) gaben weitere 112 mg Kristalle. Totalausbeute 355 mg, feine farblose Nadeln, Smp. 185–189°,  $[\alpha]_D^{26} = +53,4^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1$  in Chloroform). Auch nach Mischprobe und IR.-Spektrum identisch mit authentischem Material. Im Dünnschichtchromatogramm (Benzol-Äthylacetat-(2:1)/Kieselgel, 6 Std. Durchlauf<sup>19)</sup>) zeigte es eine genau gleiche Laufstrecke wie Octa-O-acetyl- $\alpha$ - und - $\beta$ -gentiobiase.

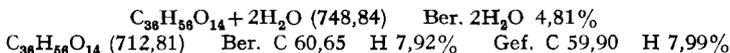
*Acobiosid A (IV).* 200 mg krist. Acovenosid C (Präp. PHA 13) wurden in 100 ml verdünntem Acetat-Puffer (1 Teil 0,01M AcOH, 6 Teile 0,01M NaOAc) entspr. pH = 5,4 gelöst, mit 200 mg «Clarase 300»<sup>14)</sup> und 20 ml Toluol versetzt und unter gelegentlichem Schütteln bei 20° stengelassen. Die papierchromatographische Kontrolle (Fig. 1) zeigte, dass nach 4 Tagen die Hydrolyse fast beendet war. Es wurde mit 200 ml abs. Alkohol versetzt, aufgeköcht und filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum auf 5 ml eingengt und 3mal mit je 10 ml Chloroform-Alkohol-(3:2) ausgeschüttelt. Die mit wenig Wasser gewaschenen und über  $Na_2SO_4$  getrockneten Auszüge gaben

<sup>17)</sup> In der früheren Mitteilung<sup>3)</sup> sind aus Versehen falsche Zahlen berechnet worden (Molgewicht 884,95 statt 874,95).

<sup>18)</sup> Kieselgel «MERCK» für Chromatographie 0,05–0,2 mm.

<sup>19)</sup> M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 17, 237 (1961).

beim Eindampfen 152 mg Rohprodukt. Es wurde an 10 g Kieselgel<sup>19</sup>) chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol-(80:20) eluierten Anteile (142 mg) gaben aus Methanol-Äther 75 mg farblose, zu Drusen vereinigte Nadeln, Smp. 248–258°,  $[\alpha]_D^{27} = -73,5^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1$  in 80-proz. Methanol). Hydrolyse mit KILIANI-Mischung im Mikromaßstab<sup>20</sup>) und Prüfung der Zucker im Papierchromatogramm gab zwei Flecke mit Laufstrecken wie Acovenose und Glucose. Trocknung 10 Std. bei 110° und 0,01 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> gab 4,83% Gewichtsverlust.



*Hexa-O-acetyl-acobiosid A (V)*. 65 mg rohes Acobiosid A (IV) (Mutterlaugenrückstand der Kristalle) wurden mit 0,6 ml abs. Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid 16 Tage auf 37° erwärmt, worauf im Papierchromatogramm nur noch *ein* Fleck sichtbar war. Die übliche Aufarbeitung gab 66 mg neutrales Rohprodukt, das bisher nicht kristallisierte. Nach Reinigung an Silicagel zeigte der farblose Schaum  $[\alpha]_D^{27} = -56,1^\circ \pm 2^\circ$  in Chf.

*Acovenosid A (VI) aus Acobiosid A (IV)*. 14 mg Acobiosid A (IV) wurden in 14 ml H<sub>2</sub>O gelöst und mit 15 mg Strophanthobiase<sup>21</sup>) und einem Tropfen Eisessig 7 Tage bei 37° stehengelassen. Danach wurde im Vakuum auf 3 ml eingengt und das Ferment mit 35 ml abs. Alkohol gefällt. Einengen des Filtrates auf ca. 1 ml und dreimaliges Ausschütteln mit je 10 ml Chloroform-Alkohol-(2:1) ergaben nach Trocknung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen im Vakuum 12 mg rohes Acovenosid A, das im Papierchromatogramm noch geringe Mengen des Ausgangsmaterials zeigte. Es wurde an 1 g SiO<sub>2</sub><sup>18</sup>) chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol-(95:5) eluierten Anteile (7 mg) ergaben aus Methanol 4 mg dünne Plättchen, Smp. 217–222°; aus Methanol-Äther wurde immer eine tiefschmelzende Form, kleine Keile vom Smp. 162–164°, erhalten. Die Kristalle waren nach Smp., Misch-Smp., Schwefelsäurefärbung und Papierchromatogramm (System Be-Thf-(4:1)/Fmd) identisch mit authentischem Acovenosid A (VI).

Die Mikroanalysen wurden von Herrn E. THOMMEN ausgeführt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die Konstitution von Acovenosid C als  $\beta$ -Gentiobiosido-acovenosid A wird bewiesen. Unklarheit besteht noch, ob der Gentiobiosido-Rest in 2'- oder in 4'-Stellung des Acovenosids A verknüpft ist. Fermentierung von Acovenosid C mit Pilzamyrase führt zu Acobiosid A, welches mit Strophanthobiase zu Acovenosid A fermentiert wird.

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

<sup>20</sup>) F. THUDIUM, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 42, 47 (1959).

<sup>21</sup>) Hergestellt nach J. SCHMUTZ & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.* 22, 359 (1947).