

- [4] A. TISELIUS & S. CLAEISSON, *Arkiv Kemi 15 B*, No. 18, 1 (1942); K. SHIMOMURA, H. F. WALTON, *Analyt. Chemistry 37*, 1012 (1965); J. HIRSCH in «Digestion, Absorption Intestinale et Transport des Glycérides chez les Animaux Supérieurs», Centre National de la Recherche Scientifique, éd., Paris 1961, S. 11; F. A. VANDERHEUVEL & J. C. SISPOS, *Analyt. Chemistry 33*, 286 (1961).
- [5] F. OEHME, *Chem. Rundschau 76*, Nr. 11, Nr. 13, Nr. 20 (1963); J. R. BENDALL, S. M. PARTRIDGE & R. G. WESTALL, *Nature 160*, 374 (1947); E. GLUEKAUF, *J. chem. Soc. 1947*, 1302; A. T. JAMES, A. J. P. MARTIN & S. S. RANDALL, *Biochem. J. 49*, 293 (1951); O. FORSANDER & P. NEUENSCHWANDER, *J. Chromatogr. 5*, 515 (1961); D. E. LASKOWSKI & R. E. PUTSCHER, *Analyt. Chemistry 24*, 965 (1952); R. N. JEFFREY, *ibid. 23*, 936 (1951).
- [6] A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc. A 127*, 9 (1930).
- [7] W. SIMON & C. TOMLINSON, *Chimia 14*, 301 (1960).
- [8] DOROTHÉE WEGMANN, C. TOMLINSON & W. SIMON, *Microchem. Journal Symposium Series, Proceedings, 1961 – International Symposium on Microchemical Techniques*, University Park, Pennsylvania, 1961. Ed.: N. D. CHERONIS, Volume II, Interscience Publishers, New York, London 1962.
- [9] J. VAN DAM, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas 83*, 129 (1964).
- [10] J. C. STERNBERG & L. M. CARSON, *J. Chromatogr. 2*, 53 (1959).
- [11] CH. CHYLEWSKI & W. SIMON, *Helv. 47*, 515 (1964); C. TOMLINSON, CH. CHYLEWSKI & W. SIMON, *Tetrahedron 19*, 949 (1963).
- [12] W. SIMON, J. T. CLERC & R. DOHNER, in Vorbereitung (vgl. International Symposium on Microchemical Techniques, University Park, Pennsylvania, 1965).

## 178. Die Cardenolide von *Parquetina nigrescens* (AFZEL.) BULLOCK<sup>1)</sup>

Glykoside und Aglykone, 270. Mitteilung [1]

von R. Berthold, W. Wehrli und T. Reichstein

(20. VIII. 65)

*Parquetina nigrescens* (AFZEL.) BULLOCK [2] (= *Periploca nigrescens* AFZEL., *Asclepiadaceae*) enthält besonders in Stamm und Wurzelholz reichlich Cardenolide [3]. Eine beim Dorf Bogona (Strasse Gemena-Karawa, Congo Oubangui) gesammelte Probe lieferte nach fermentativem Abbau mit Strophanthobiase fünf kristallisierte Genine (Strophanthidin, Strophanthidol, Nigrescigenin, sowie die Substanzen E.Sch. 12 und E.Sch. 16) und Spuren eines kristallisierten Glykosids (Substanz E.Sch. 17). Die Genine waren ursprünglich als D-Glucoside vorhanden, von denen Strophanthidin- $\beta$ -D-glucopyranosid in reiner Form isoliert wurde [4]. Wir haben die Untersuchung von *Parquetina nigrescens* erneut aufgenommen. Zuerst sollte eine grössere Menge Nigrescigenin isoliert werden, um dessen Konstitution aufklären zu können. Da das neue Material jedoch kein Nigrescigenin, dafür aber andere Stoffe enthielt, beschreiben wir hier die Analyse<sup>1a)</sup>.

**Beschaffung des Ausgangsmaterials.** – Zur Verfügung standen:

*Probe a.* 12 kg getrocknete, dünne Zweige (mit relativ viel Rinde), frei von Blättern und Früchten.

<sup>1)</sup> Auszug aus Diss. R. BERTHOLD, Basel 1962.

<sup>1a)</sup> Die Konstitution von Nigrescigenin wurde anhand des von SCHENKER [3] isolierten Materials kürzlich in unserem Institut aufgeklärt (Diss. R. BRANDT, Basel 1965, und spätere Publikation).

*Probe b.* 3,3 kg getrocknete, bis ca. 2 cm dicke Zweige, auch frei von Blättern und Früchten.

Beide Proben wurden im Frühsommer 1960 von Père CALLENS<sup>2)</sup> im Djumawald (früherer Congo belge) gesammelt und erreichten uns am 13. 7. 1960 in tadellosem Zustand<sup>3)</sup>. Eine Herbarprobe (Fig. 1) wurde nach Kew geschickt; Herr A. A. BULLOCK war so freundlich, sie zu kontrollieren, er bestätigte die Richtigkeit der Bestimmung<sup>4)</sup>. Fig. 2 zeigt zum Vergleich eine Herbarprobe des früher untersuchten Materials [3] [4].

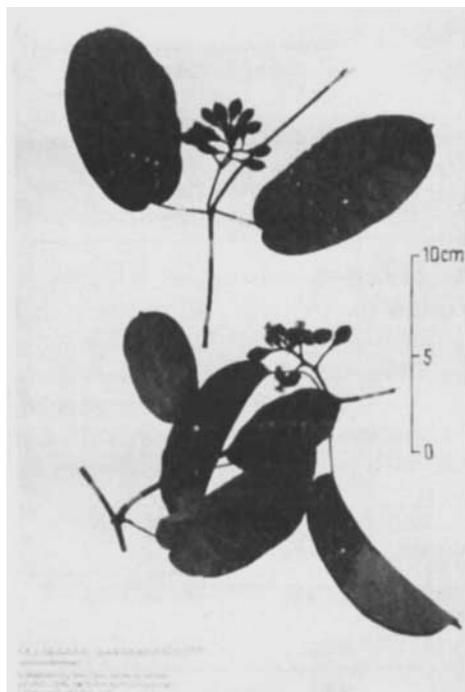


Fig. 1. *Parquetina nigrescens* (AFZEL.) BULLOCK, gesammelt von Père H. CALLENS im Djumawald (früherer Congo belge, Brief vom 1. 6. 1960).

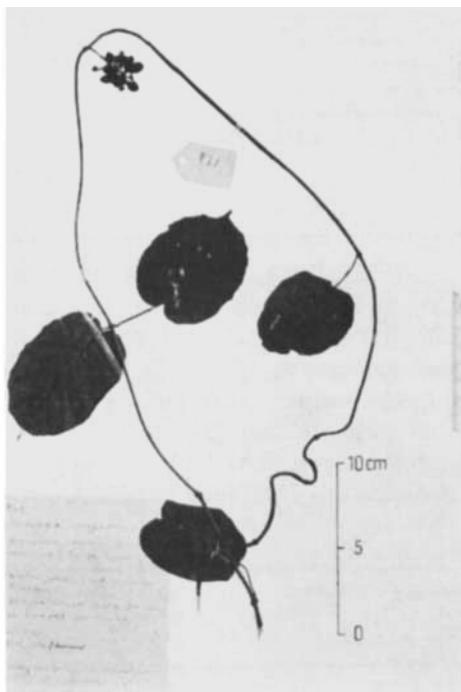


Fig. 2. *Parquetina nigrescens* (AFZEL.) BULLOCK, Herbarmuster, gesammelt von den Herren Dr. A. KATZ und Dr. P. SPEISER beim Dorf Bogona (Strasse Gemena-Karawa Congo Oubangui) am 17. Febr. 1950. Pflanze mit Blüten, reifen und unreifen Früchten. Das zugehörige Holz wurde von SCHENKER *et al.* untersucht [3].

**Extraktion und Vortrennung der Extrakte.** – *Probe a.* 1 kg Probe a (dünne Zweige) wurde wie früher beschrieben extrahiert [3] [5]. Es ergaben sich die in Tab. 1

- 2) Brief von Père H. CALLENS vom 11. 6. 1960.
- 3) Wir danken Père H. CALLENS auch hier für seine Mühe; ferner danken wir den Herren von der CIBA LEOPOLDVILLE sowie der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, für ihre Unterstützung bei der Beschaffung und beim Transport des Materials.
- 4) Wir danken Sir GEORGE TAYLOR, Direktor der Royal Botanical Gardens Kew, sowie Herrn A. A. BULLOCK auch hier bestens für ihre erneute Hilfe.

genannten Ausbeuten<sup>5)</sup>. Ein Teil (4,5 g) der stärker polaren Anteile wurde mit Strophanthobiase abgebaut<sup>6)</sup>, worauf sich durch fraktioniertes Ausschütteln die F-Extrakte gewinnen liessen (vgl. Tab. 1).

Chromatographie der Extrakte an Kieselgel lieferte keine Kristalle<sup>7)</sup>. Im Papierchromatogramm sowie bei der Dünnschichtchromatographie liess sich kein Nigrescigenin nachweisen. Auf die weitere Untersuchung dieser Proben wurde verzichtet.

Tabelle 1. Ausbeute aus 1 kg dünnen Zweigen<sup>8)</sup> (Probe a)

Art des Extraktes	Menge		Weitere Verarbeitung
	in g	in %	
Chf-Extr.	10,0	1,0	Chromatographie an Silicagel; Prüfung im Papierchromatogramm
Chf-Alk-(2:1)-Extr.	13,7	1,37	Davon 4,5 g mit Strophanthobiase fermentiert ergab: 1,37 g (= 32,0%) Chf-Extr. F 0,63 g (= 14,0%) Chf-Alk(9:1)-Extr. F 0,57 g (= 12,7%) Chf-Alk-(2:1)-Extr. F

*Probe b.* Die 3,3 kg Holz der Probe b wurden in zwei Portionen genau gleich extrahiert und gaben die in Tab. 2 genannten Ausbeuten. Die rohen Extrakte stellten komplizierte Gemische dar. Die stark polaren Gemische (Chf-Alk-Extrakte) konnten papierchromatographisch und durch Dünnschichtchromatographie nur unvollständig aufgelöst werden. Nach fermentativem Abbau gaben diese Teile aber weniger polare Stoffe, die grösstenteils mit den Stoffen des Chf-Extrakts identisch waren. In dem so gewonnenen Material (siehe unten) konnten nach präparativer Anreicherung ca. 24 digitaloide Lactone nachgewiesen werden.

Tabelle 2. Ausbeute an Rohextrakten aus Probe b<sup>8)</sup>

Art des Extraktes	Ansatz I (1 kg)		Ansatz II (2,3 kg)		Flecke im Pchr.
	Menge in g	in %	Menge in g	in %	
Chf-Extr.	5,0	0,5	9,8	0,43	$\alpha$ bis H
Chf-Alk-(2:1)-Extr.	24,6	2,46	51,0	2,22	undeutlich <sup>9)</sup>
Chf-Alk-(3:2)-Extr.	—	—	4,5	0,19	M, P, Q und stärker polare

Zur Sichtbarmachung der digitaloiden Lactone diente jeweils KEDDE-Reagens [7]<sup>10)</sup>. Sie wurden in der Reihenfolge zunehmender Polarität mit folgenden Buchstaben bezeichnet:  $\alpha_1$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A, B<sub>1</sub>, B, C, D, D', E, F, G, H<sub>1</sub>, H, J, K, L, M<sub>1</sub>,

<sup>5)</sup> Nach Ausschütteln mit Chf-Alk-(2:1)-Gemisch war die verbliebene wässrige Lösung praktisch glykosidfrei.

<sup>6)</sup> Aus Samen von *Strophanthus kombé*, vgl. [6].

<sup>7)</sup> Sie enthielten noch sehr viel KEDDE-negatives Material.

<sup>8)</sup> Abkürzungen für Lösungsmittel usw. vgl. Einleitung zum Exper. Teil.

<sup>9)</sup> Man erhielt meistens nicht aufgelöste, zusammenhängende Zonen. Dieser Extrakt wurde erst nach fermentativem Abbau genauer untersucht.

<sup>10)</sup> Dieses Reagens gibt mit allen Butenoliden eine violette Färbung. Empfindlichkeit im Pchr. ca. 0,01 mg. Ausnahmen sind 16-Ketocardenolide [8] und gewisse Benzoylderivate [9].

M, N, P. Es ist aber wahrscheinlich, dass die Flecke L bis P jeweils von zwei oder mehreren Stoffen mit ungefähr gleicher Laufstrecke stammen. Durch die weiter unten beschriebenen Trennungen konnten von diesen Stoffen sechs (A, C, E, H, J und K)

Tabelle 3. *Relative Laufstrecken der 24 in Parquetina nigrescens nachgewiesenen Cardenolide sowie einiger verwandter Stoffe im Papierchromatogramm für fünf verschiedene Systeme<sup>8)</sup>*

Stoff bzw. Fleck	Isoliert aus	Rf <sub>(A)</sub> A = Strophanthidin		Rf <sub>(Di)</sub> Di = Digi- toxinin		Rf <sub>(J)</sub> J = Convallatoxin			
		Chf/Fmd		Be-Thf- (1:1)/Fmd		Be-Chf- (7:5)/Fmd		To-Bu- (1:1)/W	Bu/W
		Wert	Fig.	Wert	Fig.	Wert	Fig.	Wert	Fig.
O-Ac-D				1,2	7				
O-Ac-G				0,57	7				
O-Ac-H				2,9		0,49	7		
O-Ac-A <sub>1</sub>				2,9		0,5	7		
O-Ac-C				2,5		0,33	7		
α <sub>1</sub>				3,8					
α				2,3	4	2,25	3	1,0	
β				1,9	4			0,22	
γ				1,5	4	1,8	3	0,14	
A <sub>1</sub>				1,1	4	1,0	3	0,05	
A <sub>2</sub>				1,05	4				
A				1,0	4	1,0	3		1,5
B <sub>1</sub>				0,87	4				
C <sub>Hyd</sub>	Synthet. C + H <sub>2</sub> (Pd)			0,79	5				
B				0,78	4				
C				0,65	4	0,61	3		1,5
D				0,58	4	0,61	3		
D'				0,53	4				
E				0,43	4,5	0,36	3		
C <sub>Red</sub>	Synthet. C + NaBH <sub>4</sub>			0,43	5				
F				0,31	4	0,36	3		
G				0,24	4	0,24	3		
H <sub>1</sub>				0,16	4				
H				0,11	4	0,12	3		
Nigrescigenin				0,07		0,36	3		1,3
J				0,05	6			1,0	8
K				0,057	6			0,91	8
L				0,028	6			0,43	8
M <sub>1</sub>								0,30	8
M								0,24	8
N								0,14	8
P								0,08	8



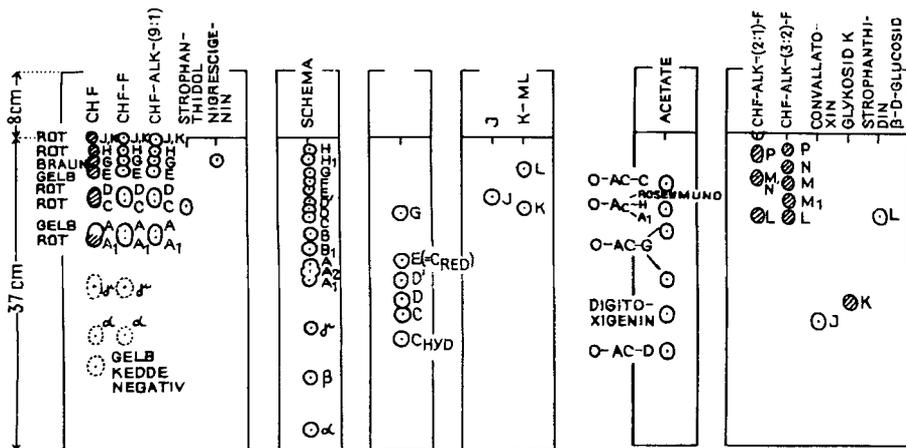


Fig. 3 Be-Thf-(1:1)/ Fmd 2<sup>3</sup>/<sub>4</sub> Std.  
 Fig. 4 Schema  
 Fig. 5 Chf/ Fmd 6 Std.  
 Fig. 6 Chf/ Fmd 48 Std.  
 Fig. 7 Be-Chf-(7:5)/ Fmd 3 Std.  
 Fig. 8 To-Bu-(1:1)/W 5<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std.

Fig. 3-8 sind Beispiele für Papierchromatogramme<sup>8)</sup>, schematisiert, aber massgetreu. Ausführung absteigend nach früheren Angaben [10]. Beladung des Papiers mit 35% Wasser [11], bzw. mit 25% Formamid. Wo keine Front (gestrichelt) eingezeichnet ist, wurde das Lösungsmittel abtropfen gelassen. Einige Chromatogramme wurden dreifach nebeneinander ausgeführt. Eine Bahn wurde mit Tetranitrodiphenyl [12] (zeigt alle Butenolide an), die zweite mit Antimontrichlorid in Chloroform [13] (blaue Fluoreszenz bei Erwärmen auf 50°, im UV.-Licht) entwickelt. Die schraffierten Flecke zeigen alle so nachgewiesenen 16-Dehydro-, 16-Hydroxy- und 16-Acetoxy-Cardenolide an. Die dritte Bahn wurde mit konz. Schwefelsäure entwickelt (entstandene Färbung ist angegeben; Ausführung vgl. Einleitung zum Exper. Teil), karminrote Färbung (wie Adonitoxin) [14] zeigen 16-Dehydro-, 16-Hydroxy- und 16-Acetoxy-strophanthidin und ihre Glykoside.

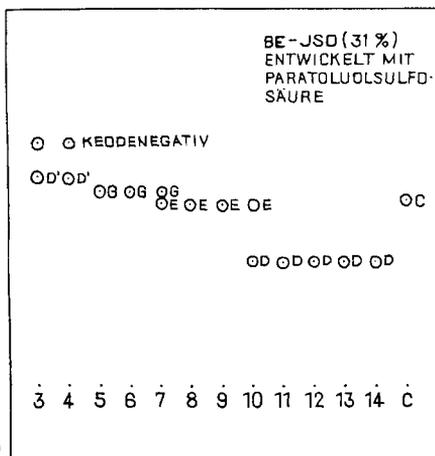


Fig. 9

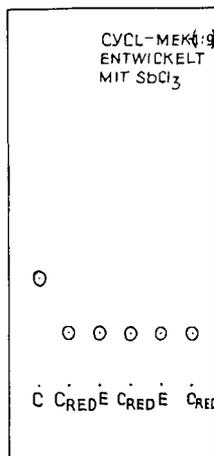


Fig. 10

Fig. 9-10 sind Beispiele für Dünnschichtchromatographie. Ausführung aufsteigend [15], meistens nach DUNCAN [16] oder auf Linienglas [17]. Entwickelt wurde durch Besprühen mit 20-proz. *p*-Toluolsulfonsäure in Alkohol und Erwärmen auf 140°, ferner mit Antimontrichlorid [13] bzw. Trichloressigsäure-«Chloramin T» [18] und Erwärmen auf ca. 50°.

in Kristallen sowie weitere sechs ( $\alpha$ ,  $\gamma$ , A<sub>1</sub>, D, D' und G) amorph, aber papierchromatographisch rein isoliert werden. Tab. 3 zeigt die relativen Laufstrecken der 24 Stoffe, bezogen auf Digitoxigenin (= Di, läuft gleich wie  $\alpha$ ), Strophanthidin (A) und Convallatoxin (J). Zum Vergleich wurden auch die Laufstrecken von fünf O-Acetylderivaten sowie von zwei Reduktionsprodukten (C<sub>Red</sub> = Genin C an der Aldehydgruppe reduziert mit NaBH<sub>4</sub> und C<sub>Hyd</sub> = Genin C hydriert in 16,17-Stellung mit Pd/CaCO<sub>3</sub>) vermerkt.

Für die papierchromatographische Kontrolle dienten unter anderem die in Fig. 3 bis 8 angegebenen Systeme und Bedingungen. Die Fig. 9 und 10 geben Beispiele für Dünnschichtchromatographie. Dabei konnten die nachgewiesenen Stoffe (auch die nicht isolierten) in zwei Gruppen eingeteilt werden:

*Gruppe I.* Nach Behandlung mit Antimontrichlorid im UV. starke blaugrüne Fluoreszenz; mit 84-proz. Schwefelsäure karminrote Färbung. Substanzen:  $\beta$ , A<sub>1</sub>, B, C, D, E, G und K, H<sub>1</sub>, H.

*Gruppe II.* Keine (oder nur sehr schwache) Fluoreszenz; mit Schwefelsäure andere Färbungen. Substanzen:  $\alpha$ ,  $\gamma$ , A, B<sub>1</sub>, D', J.

Die deutliche UV.-Fluoreszenz gaben auch die Flecke L, M<sub>1</sub>, M, N und P. (Mit Schwefelsäure wurde hier nicht geprüft.) Es ist jedoch ungewiss, ob sie alle von einer Substanz stammen. So zeigt Fleck L im Papierchromatogramm dieselbe Laufstrecke wie Strophanthidin- $\beta$ -D-glucosid. Dieses gibt jedoch diese Fluoreszenzreaktion nicht.

**Ausführung der Isolierungen<sup>11)</sup>.** – 1. *Untersuchung der Chloroformextrakte.* Im Papierchromatogramm (Fig. 3) zeigte dieses Material in zwei Systemen 9 Flecke ( $\alpha$ ,  $\gamma$ , A<sub>1</sub>, A, C, D, E, G und H). Auch im Dünnschichtchromatogramm waren dieselben 9 Flecke sichtbar. Nach präparativer Anreicherung waren noch weitere 4 Flecke ( $\alpha_1$ , A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, H<sub>1</sub>) erkennbar. Nach präparativer Isolierung zeigte sich ferner, dass der Fleck E von zwei Stoffen stammte, die in den verwendeten Systemen gleiche Laufstrecken zeigten. Durch wiederholte Chromatographie an Silicagel<sup>12)</sup> konnten die in Tab. 4 genannten Präparate isoliert werden.

Tabelle 4. Ausbeute an reinen oder nahezu reinen Cardenoliden aus dem ursprünglichen Chf-Extr. von 3,3 kg Holz

Substanz	Gefundene Menge		Schätzung der im Holz wirklich vorhandenen Menge <sup>13)</sup>	
	in mg	in %	in mg	in %
$\alpha_1$ amorph (mit $\alpha$ verunreinigt)	190	0,00575	150	0,00455
$\alpha$ amorph	48	0,00145	150	0,00455
A <sub>1</sub> amorph	31	0,00094	60	0,0018
A krist.	172	0,0052	270	0,0082
C krist.	270	0,0082	300	0,0091

<sup>11)</sup> Hier wird die Verarbeitung der 3,3 kg von Probe b beschrieben.

<sup>12)</sup> Besonders wirksam war die Chromatographie nach DUNCAN an sehr feinem Silicagel [16]. Aluminiumoxid wurde nicht verwendet, da 16-Acetoxyardenolide dadurch in 16-Dehydrocardenolide übergeführt werden [19].

Auf die Isolierung der übrigen Stoffe ( $\gamma$ , A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B, D, E, H<sub>1</sub>, H und G) wurde hier verzichtet, da sie teilweise aus den Chf-Alk-(2:1)-Extrakten nach Fermentation erhalten werden konnten.

2. *Untersuchung der Chf-Alk-(2:1)-Extrakte.* Aus diesem Material konnten direkt keine Kristalle erhalten werden. Es wurde daher mit Glucosidasen in zwei Portionen fermentativ abgebaut.

*Vorversuch.* 6,8 g Chf-Alk-(2:1)-Extrakt wurden mit 2,9 g Strophanthobiase-Präparat [6] in Citratpuffer sechs Tage bei 37° fermentiert. Fraktioniertes Ausschütteln lieferte hierauf die in Tab. 5 genannten Ausbeuten an 1F-Extrakten.

Tabelle 5. Ausbeuten nach fermentativem Abbau von 6,8 g Chf-Alk-(2:1)-Extrakt

Bezeichnung des Extraktes	Menge in g	in %	Flecke im Pchr. nach präparativer Anreicherung
Chf-1F	2,8	41	A <sub>1</sub> , A, B, C, (D), (E), (F), G, H
Chf-Alk-(9:1)-1F	2,4	35	A <sub>1</sub> , A, B, C, (D), (E), (F), G, H, J, K
Chf-Alk-(2:1)-1F	1,0	15	lange, nicht aufgelöste Zonen
Wässrige Phase 1F	0,5	7	Glucose

Danach war wiederum weitgehender Abbau der stark polaren Anteile eingetreten.

Durch Chromatographie des Chf-1F-Extraktes an Magnesiumsilikat-Kieselgur [20] liessen sich 27 mg krist. Substanz C isolieren. Nach weiteren chromatographischen Trennungen konnten ausserdem im Papierchromatogramm noch zwei weitere Cardenolide (D' und H<sub>1</sub>) festgestellt werden.

*Hauptversuch.* 70 g Chf-Alk-(2:1)-Extrakt wurden analog mit 10 g Strophanthobiase-Präparat<sup>14)</sup> fermentiert, worauf durch fraktioniertes Ausschütteln die 2F-Extrakte gewonnen wurden (vgl. Tab. 6). Da der Abbau unvollständig war, haben wir die polaren Anteile (53 g Chf-Alk-(2:1)-Extr.-2F) nochmals mit 70 g Pilzamylyase<sup>15)</sup> in Acetatpuffer pH = 5,0 zwei Tage bei 37° nachfermentiert<sup>16)</sup>, worauf durch fraktioniertes Ausschütteln<sup>17)</sup> die 3F-Extrakte erhalten wurden. Die Ausbeuten zeigen, dass nochmals weitgehender Abbau eingetreten war (Tab. 6).

Total standen somit zur Verfügung:

21,4 g = 30,5% Chf-Extr.-2F und 3F (vorwiegend Genine)

13,6 g = 19,5% Chf-Alk-(9:1)-Extr.-2F und 3F (wie oben)

18,0 g = 25,7% Chf-Alk-(3:2)-Extr.-3F (stark polares Material)

Das stark polare Material (Chf-Alk-(3:2)-Extr.-3F) wurde nicht präparativ getrennt.

Da die schwächer polaren Anteile (Chf-Extr.-2F und 3F sowie die Chf-Alk-(9:1)-Extr.-2F und 3F) qualitativ gleiche Zusammensetzung zeigten, wurden sie zusammen untersucht. Nach wiederholter Adsorptionschromatographie und einer Verteilungs-

<sup>13)</sup> Rohe Schätzung auf Grund der Ausbeuten, der Kristallisierbarkeit und der Stärke der Flecke im Papier- und Dünnschichtchromatogramm.

<sup>14)</sup> Es stand nicht mehr zur Verfügung.

<sup>15)</sup> Bezogen von der SCHWEIZERISCHEN FERMENT AG., Basel. Es handelt sich um ein Fermentpräparat aus *Aspergillus oryzae*.

<sup>16)</sup> Der Abbau wurde durch Titration der abgespaltenen Glucose verfolgt und war bereits nach wenigen Std. beendet.

Tabelle 6. *Ausbeuten bei fermentativem Abbau von 70 g Chf-Alk-(2:1)-Extrakt*

1. Fermentation: angesetzt 70 g Chf-Alk-(2:1)-Extrakt mit 10 g Strophanthobiase			
Erhaltene Extrakte	Menge		Flecke im Pchr.
	in g	in %	
Chf-2F	6,4	9,0	$\alpha$ , $\gamma$ , A <sub>1</sub> , A, C, D, E, G, H, J, K
Chf-Alk-(9:1)-2F	3,1	4,4	A <sub>1</sub> , A, C, D, E, G, H, J, K.
Chf-Alk-(2:1)-2F	53,0	76,0	L, M, N, P
Wässrige Phase	2,5	3,6	Glucose

2. Fermentation: angesetzt 53 g Chf-Alk-(2:1)-Extr.-2F mit 70 g Pilzamyase <sup>17)</sup>			
Erhaltene Extrakte	Menge		Flecke im Pchr.
	in g	in %	
Chf-3F	15,0	28,0	$\alpha$ , $\gamma$ , A <sub>1</sub> , A, C, D, E, G, H, J, K
Chf-Alk-(9:1)-3F	10,5	20,0	A <sub>1</sub> , A, C, D, E, G, H, J, K
Chf-Alk-(3:2)-3F	18,0	25,7	L, M <sub>1</sub> , M, N, P
Wässrige Phase	12,3	17,6	Glucose

Tabelle 7. *Präparative Trennung von 27 g der bei der Fermentierung erhaltenen Extrakte: Chf-Extrakt 2F und 3F sowie Chf-Alk-(9:1)-Extrakt 2F und 3F, entspr. 2,55 kg Holz*

Nr. der Chromatographie	Art der Chromatographie	Eingesetztes Material		Rein erhalten		
		Menge in g	Art des Extraktes oder der Fraktion aus vorheriger Chromatographie (Nr. angegeben)	mg	Pchr.	Krist.
Nr. 1	SiO <sub>2</sub>	15,0	Chf-3F	617	C	+
Nr. 2	SiO <sub>2</sub>	12,0	Chf-Alk-(9:1)-2F und 3F	92	C	+
Nr. 1a	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Akt. II) <sup>18)</sup>	1,2	Nr. 1, Fr. 11	10	C	+
Nr. 1b	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Akt. III)	5,1	Nr. 1, Fr. 6–7	250	C	+
Nr. 3	Verteilung an Kieselerde-Wasser	10,0	Nr. 1, Fr. 8–14	623	A	+
			Nr. 1b, Fr. 15–31	152	C	+
			Nr. 2, Fr. 8–24	30	J	+
				20	K	+
Nr. 3a	SiO <sub>2</sub>	0,15	Nr. 3, Fr. 9–16	44	$\alpha$	–
Nr. 3b	SiO <sub>2</sub>	0,03	Nr. 3, Fr. 40–46	4	$\gamma$	–
Nr. 3c	SiO <sub>2</sub> nach DUNCAN [16]	1,2	Nr. 3, Fr. 81–124	32	H	+
Nr. 3d	SiO <sub>2</sub> nach DUNCAN [16]	0,55	Nr. 3, Fr. 67–80	4	E	+
				13	G	–
				80	D	–
				60	D'	–

<sup>17)</sup> Hier wurde kein Chf-Alk-(2:1)-Extrakt bereitet, sondern nach Zusatz von Natriumsulfat direkt mit Chf-Alk-(3:2) ausgeschüttelt.

<sup>18)</sup> Diente nur zur Reinigung von C, das durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nicht weiter verändert wurde.

chromatographie (vgl. Tab. 7) konnten die Substanzen A, C, E<sup>19)</sup>, H, J und K in Kristallen, sowie die Stoffe  $\alpha$ ,  $\gamma$ , D, D' und G amorph, aber papierchromatographisch rein gewonnen werden. Die beste Trennung gab die Verteilungschromatographie sowie die Chromatographie an viel feinem Silicagel nach DUNCAN [16]. Trotzdem wurden nicht alle Substanzen in reiner Form isoliert. Tab. 8 gibt die Ausbeuten sowie eine rohe Schätzung der im Holz wirklich vorhanden gewesenen Menge<sup>20)</sup>.

Tabelle 8. Ausbeute der nach fermentativem Abbau in reiner Form isolierten Stoffe, sowie rohe Schätzung der Mengen aller nachgewiesenen Cardenolide<sup>20)</sup>

Stoff	Rein isoliert		Schätzung der im Holz wirklich vorhandenen Menge <sup>13)</sup>		
	Krist. = + amorph = -	Menge in mg <sup>21)</sup>	in % <sup>22)</sup>	in mg	in %
$\alpha_1$	nicht isoliert <sup>23)</sup>			50	0,0015
$\alpha$	-	20	0,0006	100	0,003
$\beta$	nicht isoliert			20	0,0006
$\gamma$	-	4	0,00012	50	0,0015
A <sub>1</sub>	hier nicht isoliert <sup>24)</sup>			200	0,006
A	+	780	0,024	1500	0,045
B	nicht isoliert			100	0,003
C	+	1410	0,043	2000	0,060
D	-	111	0,0034	200	0,006
D'	-	70	0,0021	150	0,0045
E <sup>18)</sup>	+	5	0,00015	50	0,0015
F	nicht isoliert			20	0,0006
G	-	81	0,0025	150	0,0045
H <sub>1</sub>	nicht isoliert			50	0,0015
H	+	40	0,0012	200	0,006
J	+	38	0,00115	200	0,006
K	+	25	0,00076	150	0,004

3. Orientierende Prüfung des Chf-Alk-(3:2)-Extraktes. Diese am stärksten polaren Anteile enthielten noch ca. 50% KEDDE-negatives Material. Sie gaben im Papierchromatogramm die Flecke L, M<sub>1</sub>, M, N und P. Eine Probe (62 mg) wurde mit 0,05N Schwefelsäure mild hydrolysiert [13b], worauf sich 5 mg Geninmisch (nach Pchr. A, B, C und (H)) mit Chf ausschütteln liessen; in der wässrigen Phase liess sich Digitoxose papierchromatographisch nachweisen. Das darin weiter verbliebene Cardenolidgemisch (L, M<sub>1</sub>, M, N und P) wurde noch mit Schneckenferment [21] in Acetatpuffer (pH 5,4) behandelt, worauf sich mit Chloroform weitere 8 mg Geninmisch (A, B, C, (E) und (H)) ausschütteln liessen. In der wässrigen Phase liess sich jetzt Glucose papierchromatographisch nachweisen; durch Ausschütteln mit Chf-

<sup>19)</sup> Die E-Kristalle gaben im Pchr. nur *einen* Fleck, erwiesen sich aber trotzdem als ein Gemisch von zwei Stoffen.

<sup>20)</sup> Die hier nachgewiesenen und isolierten Stoffe lagen im Holz als D-Glucose-Derivate vor.

<sup>21)</sup> Dort, wo nur ein Teil der Extrakte verwendet wurde, haben wir die erhaltenen Ausbeuten auf die ganzen 3,3 kg Holz umgerechnet.

<sup>22)</sup> Berechnet auf das Gewicht des luftgetrockneten Holzes.

<sup>23)</sup> Bisher nur als Gemisch mit  $\alpha$  aus dem Chf-Extr. isoliert.

<sup>24)</sup> Bisher nur amorph, aber papierchromatographisch einheitlich aus dem Chf-Extrakt isoliert.

Alk-(3:2) wurden 10 mg Extrakt erhalten, der noch dieselben fünf Flecke (L, M<sub>1</sub>, M, N und P) wie das Ausgangsmaterial zeigte. Eine Probe davon (5 mg) wurde energisch mit KILIANI-Mischung [22] hydrolysiert, wobei Digitoxose zerstört wird. Darauf liessen sich wenig Glucose und deutlich Rhamnose nachweisen.

Diese Befunde zeigen, dass der Chf-Alk-(3:2)-Extrakt ebenfalls noch stark wasserlösliche Derivate der bereits in den anderen Extrakten gefundenen Genine A, B, C, (E) und (H) enthielt, von denen ca. 10% Digitoxose direkt am Aglykon gebunden haben dürften, während ein grösserer Teil nur D-Glucose enthielt. Es ist möglich, dass auch noch Cardenolid-rhamnoside vorkommen<sup>25)</sup>. Es besteht auch die Möglichkeit, dass einige der Flecke L, M<sub>1</sub>, M, N und P von mehr als einem Stoff herrühren.

**Charakterisierung der isolierten und nachgewiesenen Stoffe.** – Die wichtigsten physikalischen Eigenschaften der in reiner Form isolierten Stoffe sind in Tab. 9 zusammengestellt. Farbreaktionen mit Schwefelsäure vgl. Tab. 10, UV.-Absorptionsspektren Fig. 11, 12 und 13, einige IR.-Absorptionsspektren Fig. 14, 15 und 16, und relative Laufstrecken im Papierchromatogramm Tab. 3. Die Substanzen A (= Strophanthidin), H (= Strophadogenin = 16 $\beta$ -Hydroxystrophanthidin<sup>26)</sup>) und J (= Convallotoxin) konnten durch Schmelzpunkt, Misch-Smp., Drehung, Farbreaktionen, Papierchromatogramm sowie in Form der O-Acetylderivate mit bekannten Cardenoliden identifiziert werden. Über die Konstitutionsermittlung von 5 weiteren reinen Stoffen (A<sub>1</sub>, C, D, E und K) wird in der folgenden Mitteilung berichtet [23]; die Resultate sind bereits in Tab. 9 enthalten.

*Diskussion der UV.-Absorptionsspektren.* Die Substanzen C, C<sub>Red</sub> und D haben in 16,17-Stellung eine Doppelbindung, die in Konjugation zum Butenolidring steht. Die Absorptionsmaxima liegen daher bei 268–270 nm ( $\log \epsilon = 4,2$ ) [19]. Manchmal ist auch eine Vorbande bei 220–226 nm ( $\log \epsilon = \text{ca. } 3,6$ ) sichtbar. Die Substanzen A<sub>1</sub>, G und K zeigen dagegen ein Maximum, das im Vergleich zu Digitoxigenin (217 nm) ein wenig nach kürzeren Wellenlängen verschoben ist. Gefunden wurde für A<sub>1</sub> (amorph) 213 nm ( $\log \epsilon = 4,11$ ), für G (amorph) 213 nm ( $\log \epsilon = 4,26$ ) und für K 214 nm ( $\log \epsilon = 4,19$ ). Alle drei enthalten vermutlich eine Acetoxygruppe in 16-Stellung. Eine ähnliche kleine Verschiebung wurde auch bei 16-Acetoxycardenoliden von gesicherter Konstitution gefunden. Die Maxima lagen für Oleandrigenin bei 215 nm ( $\log \epsilon = 4,15$ ), für 3,16-Di-O-acetyl-strophanthidin bei 215 nm ( $\log \epsilon = 4,07$ ) und für 3,16-Di-O-acetyl-gitoxigenin bei 215 nm ( $\log \epsilon = 4,15$ ). Auch Substanz D' zeigte ein Maximum bei 214 nm, hier war die Kurve zum Unterschied mit den obengenannten 16-Acetoxy-Derivaten jedoch auch deutlich asymmetrisch, und nach Hydrierung konnte im amorphen Produkt eine isolierte Doppelbindung nachgewiesen werden ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{Alk}} < 196 \text{ nm}$  ( $\log \epsilon$  bei 196 nm = 3,74) [32]).

<sup>25)</sup> Die Rhamnose könnte aber auch aus den KEDDE-negativen Verunreinigungen stammen.

<sup>26)</sup> 16 $\beta$ -Hydroxystrophanthidin ist erstmals von ROSENMUND & REICHSTEIN [24] aus Adovern (industriell hergestellter Extrakt aus dem Kraut von *Adonis vernalis*) über das krist. Di-O-acetylderivat isoliert worden. Auch PITRA & ČEKAN [25] isolierten diesen Stoff aus *Adonis vernalis*, klärten die Struktur auf und nannten ihn Strophadogenin. Die Identität mit dem älteren Präparat [24] wurde durch direkten Vergleich sichergestellt. Wir danken Herrn Dr. ČEKAN auch hier für die Überlassung einer Probe seines Präparates.

Tabelle 9. *Physikalische Eigenschaften und chemischer Nachweis der isolierten Stoffe sowie von 16-Dehydrostrophanthidin (= C<sub>Rcd</sub>) und 17- $\alpha$ -Strophanthidin (= C<sub>Hvd</sub>). Vergleich der gefundenen Daten mit den Literaturwerten*

Substanz	Identifiziert mit oder erkannt als	Smp. in °C [spez. Drehung]		Xanthydrol-Probe [26]	Fiegl.-Probe [27]	Fluoreszenz mit		Bewiesene oder vermutliche Bruttoformel	Maxima im UV, $\eta^D$ $\lambda$ in nm (log $\epsilon$ )	Gesicherter oder (in Klammern) pchr. Nachweis der Verbindungskomponenten und der hergestellten Derivate
		Gefunden	Literatur			SPCl <sub>3</sub> [13a]	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> [28]			
$\alpha$	nicht aufgeklärt	amorph	—	—	—	—	—	—	216 (3,86) 270 (3,03) S	Genin
$\gamma$	nicht aufgeklärt	amorph	—	—	—	—	—	—	—	Genin
A <sub>1</sub>	16- $\beta$ -Acetoxystrophanthidin; neu (s. [23])	amorph	—	—	—	+	+	C <sub>25</sub> H <sub>33</sub> O <sub>8</sub>	213 (4,11) 270 (2,86) S <sup>28</sup> )	3-O-Acetyl-16-acetoxystrophanthidin Smp. 232–237°
A	Strophanthidin; bekannt	136–144/ 217–226° [+40,8 $\pm$ 2°] in Me	138–144/ 228–241° [+43,2 $\pm$ 2°] in Me [3]	—	—	—	—	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	217 (4,21) 305 (1,54) nach Lit. [3]	Strophanthidin
C <sub>Hvd</sub>	17- $\alpha$ -Strophanthidin; bekannt	247–249° [+35,9 $\pm$ 2°] in Me	248–250° [+37,0 $\pm$ 2°] in Me [29]	—	—	—	—	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	218 (4,19)	17- $\alpha$ -Strophanthidin
C	16-Dehydrostrophanthidin; neu (s. [23])	226/253–262° [+82,3 $\pm$ 2°] in Me-W-(1:1)	—	—	—	+	+	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	268 (4,20) 226 (3,6) S	3-O-Acetyl-16-dehydrostrophanthidin, Smp. 191–195° [+92,1 $\pm$ 3°] in Chf [23]
D	16-Dehydrostrophanthidin- $\beta$ -D-digitoxosid; neu (s. [23])	amorph	—	+	+	+	+	C <sub>29</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub> oder C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>14</sub>	269 (4,20) 205 (3,95) MG. 698	16-Dehydrostrophanthidin (Digitoxose) Acetat amorph

D'	Teilweise aufgeklärt	amorph	–	–	–	–	–	–	–	214 (3,99) 274 (2,63) S	Genin Mikrohydrierung: UV. $\lambda_{max}$ 196 nm, $\log \epsilon = 3,72$ in Alk.
E	Gemisch von 16-Dehydrostrophanthidol und unbekanntem Digitoxosid (s. [23])	175–183/ 252–262°	–	+	+	+	+	–	–	210 (4,04) 270 (3,88) 315 (2,66) <sup>28)</sup> 329 (2,6 ) <sup>28)</sup> MG. 551	unbekanntes Genin, 16-Dehydrostrophanthidol (Digitoxose)
C <sub>Red</sub>	16-Dehydrostrophanthidol, neu	242–247° [+68,9 ± 2°] in Me-Chf-(1:1)	–	–	–	–	–	–	–	269 (4,16) 218 (3,71) <sup>28)</sup>	16-Dehydrostrophanthidol
G	nicht aufgeklärt	amorph	–	–	–	–	–	–	–	213 (4,26) 270 (3,11) <sup>28)</sup> MG. 565	Genin, Acetat amorph
H	16 $\beta$ -Hydroxystrophanthidin (= Strophadogenin); bekannt	233–237° [+50,1 ± 2°] in Alk	238–241° [+52,9 ± 2°] in Alk [24]	–	–	–	–	–	–	216 (4,11) 268 (3,00) S <sup>28)</sup>	3-O-Acetyl-16-acetoxy-strophanthidin Smp. 232–237°
J	Convallatoxin	237–247° [+2,2 ± 2°] in Me	[0 ± 2°] in Me [30]	–	–	–	–	–	–	216 (4,24) 268 (2,55) S <sup>28)</sup>	Strophanthidin (Rhamnose)
K	16 $\beta$ -Acetoxy-strophanthidin-rhamnosid; neu (s. [23])	262–268° [–13,4 ± 2°] in Me	–	–	–	–	–	–	–	214 (4,19) 268 (2,78) <sup>28)</sup>	16 $\beta$ -Acetoxy-strophanthidin (Rhamnose)

<sup>27)</sup> Vgl. Fig. 11, 12 und 13; S = Schulter.

<sup>28)</sup> Stammt vermutlich von einer Spur Verunreinigung.

Tabelle 10. *Farbreaktionen mit 84-proz. Schwefelsäure* [31]

Substanz	Zeit						
	1''	1'	5'	10'	20'	60'	120'
<i>Gruppe I</i>							
3-O-Ac-A <sub>1</sub>	gelb	gelb	rosa	blaurot	blaurot	gelb	farblos
A <sub>1</sub>	gelb	orange	rot	blaurot	blaurot	blaurot	gelb
C	gelb	rot	blaurot	blaurot	blaurot	blaurot	blaurot Rand: gelb
3-O-Ac-C	gelb	rosa	hellrot	hellrot	blaurot	blaurot	gelb
C <sub>Red</sub>	gelbgrün	hellrot	hellrot	blaurot	blaurot	gelbgrün	gelb
D	gelb	rotbraun	blaurot braun	blaurot	blaurot	olivgrün	graugrün
E	gelb	rot	blaurot	blaurot	blaurot	blaurot	gelbbraun
G	gelb	rotbraun	rot	rot	blaurot	rot	gelbbraun
H	gelb	rot	blaurot	blaurot	blaurot	blaurot	gelb
3-O-Ac-16-O-Ac-H	gelb	gelb	rosa	blaurot	blaurot	gelb	farblos
K	gelb	orange	rot	blaurot	blaurot	blaurot	gelb
<i>Gruppe II</i>							
$\alpha$	gelb	gelb	orange	hellrot	blaurot	gelb	gelb
$\gamma$	hellgelb	gelb	hellbraun	braun	braun	braungrün	grau Rand: grün
D'	gelb	gelb- orange	braun- orange	braun	olivgrün	olivgrün	grau

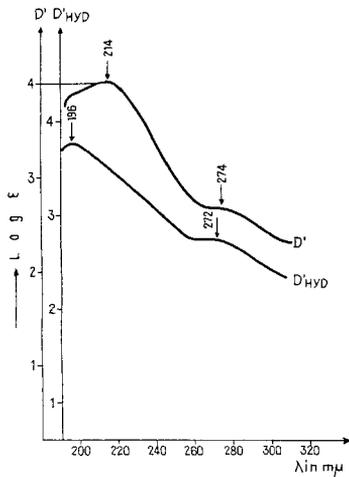
Fig. 11, 12 und 13 sind UV.-Absorptionsspektren in Alkohol<sup>29)</sup>

Fig. 11

D' = *R.Be.11*. Maximum bei 214 nm ( $\log \epsilon = 3,99$ )  
 und Schulter bei 274 nm ( $\log \epsilon = 2,63$ )<sup>30)</sup>.  
 Ber. auf MG. 372, C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> (Nr. 3749)

D'<sub>Hyd</sub> = D' nach Hydrierung in Pt|Eisessig. Maximum  
 bei 196 nm ( $\log \epsilon = 3,74$ ) und Schulter bei 272  
 nm ( $\log \epsilon = 2,73$ )<sup>30)</sup> (Nr. 3825)

<sup>29)</sup> Aufgenommen von den Herren R. BÜHRER und K. LIEBL mit einem BECKMAN-Spektrophotometer Modell DK 2.

<sup>30)</sup> Stammt von Spur Verunreinigung mit 16-Dehydro-Derivat. Die dadurch hervorgerufene Schulter verdeckt auch das schwache Maximum der Aldehydgruppe, das bei ca. 305 nm liegt.

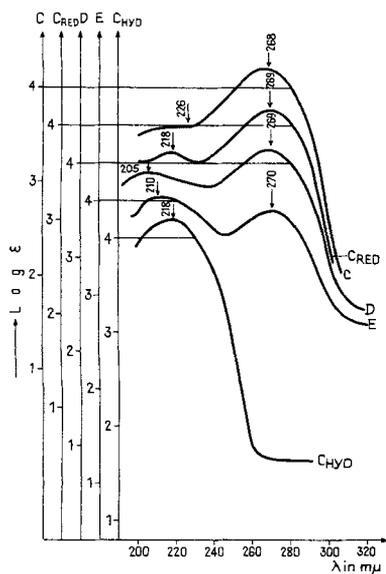


Fig. 12

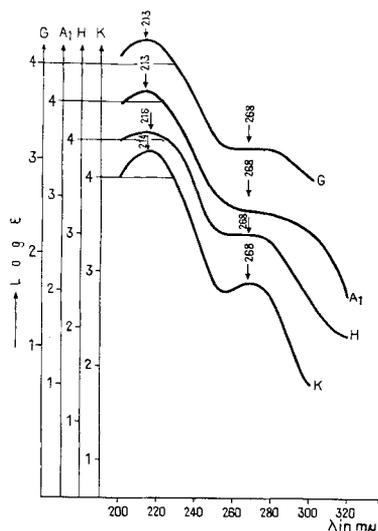


Fig. 13

- Fig. 12  $C_{Hyd}$  = 17 $\alpha$ -Strophanthidin. Maximum bei 218 nm ( $\log \epsilon = 4,17$ ) und Schulter bei 284 nm ( $\log \epsilon = 1,57$ ). Ber. auf MG. 404,  $C_{23}H_{32}O_6$ . (Nr. 3766)
- C = 16-Dehydrostrophanthidin. Maximum bei 268 nm ( $\log \epsilon = 4,2$ ) und Schulter bei 226 nm ( $\log \epsilon = 3,6$ ). Ber. auf MG. 404,  $C_{23}H_{32}O_6$ . (Nr. 3360)
- D = 16-Dehydrostrophanthidin + (x)Digitoxose. Ber. auf MG. 611,  $C_{31}H_{47}O_{12}$ , für (x) = 1 und eine Acetylgruppe: Maxima bei 205 nm ( $\log \epsilon = 3,89$ ) und 269 nm ( $\log \epsilon = 4,14$ ). Ber. auf MG. 698,  $C_{35}H_{54}O_{14}$  für (x) = 2: Maxima bei 205 nm ( $\log \epsilon = 3,95$ ) und 269 nm ( $\log \epsilon = 4,19$ ).
- $C_{Red}$  = 16-Dehydrostrophanthidol. Maxima bei 218 nm<sup>31)</sup> ( $\log \epsilon = 3,71$ ) und 269 nm ( $\log \epsilon = 4,17$ ). Ber. auf  $C_{23}H_{32}O_6$ , MG. 404. (Nr. 3815)
- E = Gemisch aus  $C_{Red}$  und einem im Pchr. gleichlaufenden Digitoxosid. Maxima bei 210 nm ( $\log \epsilon = 4,04$ ), 270 nm ( $\log \epsilon = 3,88$ ), 215 nm ( $\log \epsilon = 2,66$ ), 329 nm ( $\log \epsilon = 2,6$ )<sup>32)</sup>. Ber. auf MG. 551,  $C_{29}H_{45}O_{10}$ . (Nr. 3639)

- Fig. 13  $A_1$  = 16-Acetoxystrophanthidin. Maximum bei 213 nm ( $\log \epsilon = 4,12$ ) und Schulter bei 268 nm ( $\log \epsilon = 2,8$ )<sup>30)</sup>. Ber. auf MG. 462,  $C_{25}H_{34}O_8$ . (Nr. 3725)
- G = R.Be.6. Maximum bei 213 nm ( $\log \epsilon = 4,26$ ) und Schulter bei 268 nm ( $\log \epsilon = 3,11$ )<sup>30)</sup>. Ber. auf MG. 565,  $C_{29}H_{41}O_{11}$ . (Nr. 3640)
- H = Strophanthogenin = 16-Hydroxystrophanthidin. Maximum bei 216 nm ( $\log \epsilon = 4,11$ ) und Schulter bei 268 nm ( $\log \epsilon = 3,0$ )<sup>30)</sup>. Ber. auf MG. 421,5,  $C_{23}H_{33}O_7$ . (Nr. 3707)
- K = 16-Acetoxystrophanthidin-rhamnosid. Maxima bei 214 nm ( $\log \epsilon = 4,27$ ) und 268 nm ( $\log \epsilon = 2,87$ )<sup>30)</sup>. Ber. auf MG. 763,  $C_{35}H_{55}O_{18}$ . Ber. auf MG. 623,  $C_{31}H_{43}O_{13}$ : Maxima bei 214 nm ( $\log \epsilon = 4,19$ ) und 268 nm ( $\log \epsilon = 2,78$ ). (Nr. 3626)

IR.-Absorptionsspektren von C,  $C_{Red}$  und  $C_{Hyd}$ . In den Figuren 14–16 sind die IR-Spektren der Substanzen C (= 16-Dehydrostrophanthidin),  $C_{Red}$  (= 16-Dehydrostrophanthidol) und  $C_{Hyd}$  (= 17 $\alpha$ -Strophanthidin) wiedergegeben, sie dienen der Charakterisierung dieser Stoffe.

<sup>31)</sup> Stammt vermutlich von einer Spur Butenolid ohne 16,17-Doppelbindung.

<sup>32)</sup> Stammt von einer Spur Verunreinigung.

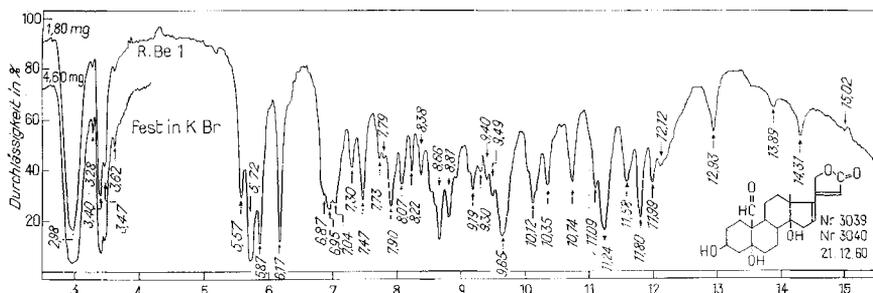


Fig. 14. IR.-Absorptionsspektrum von Substanz C (= 16-Dehydrostrophanthidin), fest in KBr<sup>33)</sup>

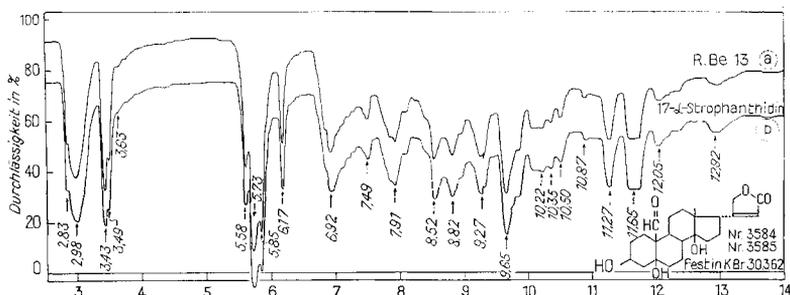


Fig. 15. IR.-Absorptionsspektrum von 17 $\alpha$ -Strophanthidin, fest in KBr<sup>33)</sup>. a = C<sub>Hyd</sub> (erhalten nach partieller Hydrierung von Subst. C); b = authentisches Vergleichsmaterial (aus 17 $\alpha$ -Cymarin)

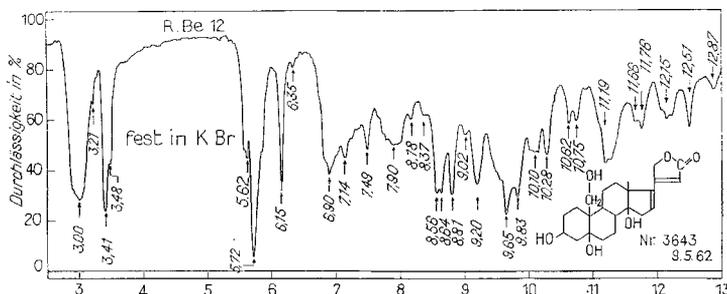


Fig. 16. IR.-Absorptionsspektrum von Substanz C<sub>Red</sub> (= 16-Dehydrostrophanthidin), fest in KBr<sup>33)</sup>

**Diskussion der Ergebnisse.** – Wie aus der hier beschriebenen Untersuchung einer neuen Probe des Holzes von *Parquetina nigrescens* hervorgeht, unterscheidet sich diese chemisch stark von dem Holz, das SCHENKER *et al.* [3] analysierten. Das hier untersuchte Material enthält kein Nigrescigenin, auch nicht die Substanzen E.Sch. 12, 16 & 17. Dafür fand man eine Reihe von Stoffen, die eine 16,17-Doppelbindung haben oder in 16-Stellung mit einer HO- oder AcO-Gruppe substituiert sind. So konnte 16-Dehydrostrophanthidin in relativ grossen Mengen, 16-Hydroxystrophanthidin und 16-Acetoxy-strophanthidin in kleineren Mengen isoliert werden. Lediglich Strophan-

<sup>33)</sup> Aufgenommen von den Herren R. BÜHRER und K. LIEBL in einem PERKIN-ELMER double beam Spektrophotometer mit NaCl-Prisma.

thidin war in beiden Proben in ungefähr gleichen Anteilen enthalten. Die genannten Unterschiede sind auffallend, da das analysierte Material in beiden Fällen von den Botanikern in Kew kontrolliert und als *Parquetina nigrescens* identifiziert wurde. Es ist aber zu berücksichtigen, dass *Parquetina nigrescens* nach BULLOCK<sup>34)</sup> eine polymorphe Art darstellt. Wir vermuten, dass es sich bei dem von uns untersuchten Material um zwei Varianten derselben Art gehandelt hat, die morphologisch nicht genau differenziert werden können, aber chemisch starke Unterschiede zeigen. Gewisse chemische Ungleichheiten könnten eventuell auch auf verschiedenes Alter der Holzproben oder auf geschlechtliche Unterschiede zurückzuführen sein. Zu den hier erhaltenen Extrakten ist noch folgendes zu bemerken: Schon der Chloroform-Extrakt vor der Fermentation enthielt ansehnliche Mengen derselben Genine und Glykoside, die durch Fermentierung auch aus den Chf-Alk-(2:1)-Extrakten gewonnen werden konnten. Möglicherweise ist ein Teil der Glucoside schon beim Trocknen des Holzes oder während der Extraktion gespalten worden<sup>35)</sup>.

Ob das als Hauptprodukt gefundene 16-Dehydrostrophanthidin ursprünglich in der Pflanze vorhanden war, liess sich nicht sicher feststellen. Es ist bekannt, dass Acetoxygruppen in 16-Stellung von Cardenoliden sich leicht eliminieren lassen [19]. Aus diesem Grunde wurde die Aufarbeitung schonend durchgeführt, insbesondere wurden (ausser in zwei Fällen) keine Chromatographien auf Aluminiumoxid vorgenommen. Wir glauben daher, dass 16-Dehydrostrophanthidin bereits in der von uns erhaltenen Holzprobe anwesend war.

Die Hauptmenge der digitaloiden Derivate stellen die Glykoside dar. Diese lagen als kompliziertes Gemisch wasserlöslicher Substanzen vor. Bisher gelang es, drei einheitliche Glykoside zu isolieren: D (= 16-Dehydrostrophanthidin- $\beta$ -D-digitoxosid), J (= Convallatoxin) und K (= 16-Acetoxystrophanthidin-rhamnosid). Polarere Substanzen als K konnten nicht in reiner Form gefasst werden, jedoch befinden sich unter den auf K folgenden Substanzen wahrscheinlich Strophanthidin- $\beta$ -D-glucosid (Laufstrecke wie L im Pchr.) und die Glucoside und Rhamnoside des 16 $\beta$ -Hydroxystrophanthidins und seiner Verwandten.

Insgesamt konnten papierchromatographisch drei Zucker nachgewiesen werden: Glucose, Rhamnose und Digitoxose. SCHENKER *et al.* fanden in ihren Extrakten dagegen nur Glucose [3]. Es wurden hier keine Versuche unternommen, um die D-Glucose-Derivate zu isolieren. Sie wurden fermentativ soweit wie möglich abgebaut. Da der Abbau dabei weitgehend bis zur Aglykonstufe erfolgte und da Strophanthobiase speziell Strophanthidin- $\beta$ -D-glucosid und ähnliche Stoffe abzubauen vermag [3], dürfte der unfermentierte Extrakt reichliche Mengen von  $\beta$ -D-Glucosiden enthalten haben. Wie oben erwähnt enthielt das Glykosidgemisch auch Digitoxoside und Rhamnoside. Ein Teil dieser Stoffe muss ursprünglich noch mit D-Glucose verknüpft gewesen sein, die bei der Fermentation abgespalten wurde.

Fast alle der gefundenen Cardenolide lassen sich vom Strophanthidin oder 16 $\beta$ -Hydroxystrophanthidin herleiten. Dieser letztere Stoff und seine Verwandten zeigen mit 84-proz. Schwefelsäure eine auffallende karminrote Färbung. Eine praktisch gleiche Färbung zeigen Adonitoxigenin [24] und seine Derivate, die ebenfalls 16-

<sup>34)</sup> Brief vom 11. 2. 1962.

<sup>35)</sup> *Periploca graeca* enthält auch glykosidspaltende Fermente [33].

Hydroxycardenolide mit einer Aldehydgruppe am C-10 darstellen. Die Reaktion ist für eine orientierende Differenzierung sehr nützlich. Die Trennungen machten teilweise erhebliche experimentelle Schwierigkeiten, daher gelang es auch nicht, alle nachgewiesenen Stoffe in reiner Form zu isolieren. Immerhin glauben wir die wichtigsten Vertreter gefasst zu haben, so dass ein guter Einblick in den Bau der vorhandenen Glykoside gewonnen werden konnte.

Die Anschaffung des untersuchten Pflanzenmaterials wurde uns durch Mittel aus den ARBEITSBESCHAFFUNGSKREDITEN DES BUNDES ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG ermöglicht, wofür auch hier bestens gedankt sei.

Ferner danken wir dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS für einen Beitrag an die Kosten der Arbeit.

### Experimenteller Teil

**1. Allgemeines.** – Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze bei der hier benützten Ausführung bis 200° etwa  $\pm 2^\circ$ , darüber  $\pm 3^\circ$ . Substanzproben für Drehungen und Spektren wurden 48 Std. bei 740 Torr im Exsikkator über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet. Zur Verbrennungsanalyse wurde 5 Std. bei 0,01 Torr und 90° getrocknet. Übliche Aufarbeitung heisst Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in  $\text{Chf}$  oder  $\text{Chf-Ac}$ -(1:3), Waschen mit 2N  $\text{HCl}$ , 2N Sodalösung und Wasser, Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen bei 40–45° im Vakuum. Zur Chromatographie<sup>36)</sup> und zur Abspaltung von 16-Acetoxygruppen [19] wurde neutrales  $\text{Al}_2\text{O}_3$  von MERCK verwendet, zur Chromatographie ferner Kieselgel von MERCK, Korngrösse 0,05–0,20 mm. Silikatgemisch ist das nach DOBRINER *et al.* [20] bereitete Gemisch aus Mg-Silicat und gewaschenem Kieselgur im Verhältnis 2:1. Für die folgenden Nachweismethoden und Reaktionen dienten frühere Angaben: Papierchromatographie der Cardenolide [10] [11], der Zucker [35]; KEDDE-Reaktion [7] und Reaktion mit Tetranitrodiphenyl [12]; Fluoreszenzproben mit  $\text{SbCl}_3$  [13a] und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  [28]; Reaktion mit 84-proz. Schwefelsäure [31]; Xanthhydroprobe [26]; Zuckernachweis mit Anilin-hydrogenphthalat [36], Vanillin-Perchlorsäure [37] und FEIGL-Reagens [27], Glucosebestimmung mit FEHLING'scher Lösung [38]; milde saure Hydrolyse mit 0,05N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  im Mikromaßstab [13b] und energische saure Hydrolyse mit KILIANI-Mischung [22].

Verwendete Abkürzungen:  $\text{AcOH}$  = Eisessig,  $\text{Ac}_2\text{O}$  = Acetanhydrid, Ae = Diäthyläther, An = Aceton, Alk = Äthanol, Be = Benzol, Bu = *n*-Butanol, Chf = Chloroform, Cycl = Cyclohexan, Fmd = Formamid, Iso = Isopropanol, Me = Methanol, Mek = Methyläthylketon, Py = Pyridin, Thf = Tetrahydrofuran, To = Toluol, W = Wasser; Fr. = Fraktion, ML = eingedampfte Mutterlauge, Pchr. = Papierchromatogramm(e) und Papierchromatographie.

*Entwicklung von Papierchromatogrammen mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .* Die zu untersuchende Substanz wurde jeweils zweimal auf dem Papier aufgetragen. Nach der Chromatographie zerschneidet man das Papier der Länge nach. Eine Bahn wurde mit KEDDE-Reagens [7] entwickelt, die andere mit Wasser leicht angefeuchtet und auf eine Porzellanplatte geklatscht. An den entsprechenden KEDDE-positiven Stellen betupfte man das Papier mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Derivate des 16-Hydroxystrophanthidins wurden schnell durch charakteristische Rotfärbung sichtbar [14]. Andere Substanzen wie Strophanthidin geben nur eine schwache Gelbfärbung.

**2. Untersuchung von Probe a (dünne Zweige).** – 1 kg dünne Zweige wurden fein gemahlen, mit drei l W versetzt und unter  $\text{CO}_2$  18 Std. bei 20° stehengelassen. Die weitere Extraktion geschah nach früherer Vorschrift [3], vgl. auch Angaben bei Probe b.

*Trennungsversuch am Chf-Extrakt.* Der Chf-Extrakt wurde an  $\text{SiO}_2$  chromatographiert, gab aber keine Kristalle. Er wurde nicht weiter untersucht.

*Untersuchung des Chf-Alk-(2:1)-Extr.* 4,5 g Chf-Alk-(2:1)-Extr. wurden mit 3,9 g Strophanthobiaspräparat [6], gewonnen aus den Samen von *Strophanthus kombé*, 50 ml W, 30 ml 0,1M Citratpuffer pH 5,2 [39] und 1 ml To versetzt und 6 Tage bei 37° stehengelassen. Dann wurde die Lösung mit 500 ml auf –20° vorgekühltem Alk vermischt, so dass die Hauptmenge des Fermentes ausfiel. Nach kurzem Stehenlassen wurde abgenutscht und mit kühlem Alk, dann mit Ae nach-

<sup>36)</sup> Chromatographiert wurde nach der Durchlaufmethode [34] und nach einer Methode von DUNCAN [16].

gewaschen. Das klare Filtrat wurde im Vakuum eingengt und vollständig von organischen Lösungsmitteln befreit. Daraufhin wurde 8mal mit je 150 ml Chf und Chf-Alk-(2:1) ausgeschüttelt. Die wie oben gewaschenen und getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 1,37 g Chf-Extr., 0,63 g Chf-Alk-(9:1)-Extr., 0,57 g Chf-Alk-(2:1)-Extr. (vgl. Tab. 1). Ein Teil der wässrigen Restlösung wurde mit FEHLING'scher Lösung [38] auf reduzierende Substanzen untersucht, der gestufte Wert entsprach 0,6 g Glucose. Der Chf-Alk-(9:1)-Extrakt wurde an  $\text{SiO}_2$  chromatographiert; keine der Fr. liess sich jedoch kristallisieren.

**3. Untersuchung der Probe b (dicke Zweige).** – *Ansatz I.* 1 kg dicke Zweige, frei von Blättern und Blüten, wurde fein zugehen und unter  $\text{CO}_2$  mit 3 l W bei  $20^\circ$  16 Std. stehengelassen. Dann wurden 3 l 95-proz. Alk gegeben und 2 Std. auf  $50^\circ$  erwärmt. Hierauf wurde durch eine Schicht gewaschenen Kieselgurs [40]<sup>37)</sup> scharf abgenutscht. Anschliessend wurde das Pulver bei  $60^\circ$  mit je 2–3 l 50-proz. (1mal), 60-proz. (2mal) und je 1mal mit 70-proz. und 75-proz. Alk jedesmal ca. 2 Std. extrahiert. Es war dann nicht mehr bitter und wurde verworfen. Die vereinigten Filtrate (15,5 l) wurden im Vakuum auf 1,6 l eingengt und mit einer Suspension von Bleihydroxid (aus 1 kg Bleiacetat-trihydrat) in 1,6 l Alk [49]<sup>38)</sup> versetzt, 20 Min energisch geschüttelt und durch Celite filtriert. Das Filtrat wurde mit verd. Schwefelsäure auf pH 5–6 gestellt und im Vakuum auf 400 ml eingengt. Das wässrige Konzentrat wurde 5mal mit je 400 ml Chf und 13mal mit je 400 ml Chf-Alk-(2:1) ausgeschüttelt. Das Resultat zeigt Tab. 2. Die wässrige Lösung war daraufhin KEDDE-negativ und nicht mehr bitter; sie wurde verworfen.

*Ansatz II* (2,3 kg Holz). Die Extraktion geschah entsprechend Ansatz I mit dem Unterschied, dass die zuletzt erhaltene wässrige Phase halb mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gesättigt und 3mal mit je 500 ml Chf-Alk-(3:2) ausgeschüttelt wurde [40]. Ausbeuten vgl. Tab. 2.

**3. Ausführung der Isolierungen (aus Probe b).** – a) *Untersuchung des Chf-Extrakts.* 11,8 g Chf-Extrakt (= 1,84 kg Holz) wurden zunächst an 200 g  $\text{SiO}_2$  grob in 15 Fraktionen aufgetrennt. Die Fr. 1–5 (1,5 g, eluiert mit Chf-Be-(1:1)) waren KEDDE-negativ und wurden nicht untersucht. Die Fr. 5–10 (6,28 g, eluiert mit Chf-Me-(99:1)) waren stark KEDDE-positiv, sie dienten für die folgende Chromatographie. Die Fr. 11–15 (= 2,3 g, eluiert mit Chf-Me-(95:5) bis Chf-Me-(9:1)) waren KEDDE-negativ und wurden verworfen.

Die 6,2 g Fr. 5–10 der ersten Chromatographie wurden erneut an 100 g  $\text{SiO}_2$  sorgfältig chromatographiert. Über die Ergebnisse orientiert Tab. 11.

Tabelle 11. *Chromatographie von 6,2 g Fr. 5–10 aus erster Chromatographie des Chf-Extrakts, an 100 g  $\text{SiO}_2$*

Fr. Nr.	Lösungsmittel 300 ml pro Fr.	Eindampfrückstand			
		Ausbeute in mg	KEDDE- Reaktion	Flecke im Pchr.	Weitere Verarbeitung
1–10	Be bis Chf	1456	–	–	{ nicht weiter untersucht
11–13	Chf-Me-(99:1)	378	+	$\alpha_1, \alpha$	
14	Chf-Me-(99:1)	730	+	$\alpha_1, \alpha$	Chromat. an $\text{SiO}_2$
15–16	Chf-Me-(99:1)	141	+	$\alpha, \gamma, A$	nicht untersucht
17–22	Chf-Me-(95:5)	2280	+	$\gamma, A, B, C, D, E, H_1$	DUNCAN-Säule, Tab. 12
23–30	Chf-Me-(90:10) bis Me	781	+	(B), D, E, $H_1$	nicht untersucht

Fr. 14 wurde nochmals an 21 g  $\text{SiO}_2$  chromatographiert, wobei sich 37 mg amorphe Subst.  $\alpha$  (nach Pchr. einheitlich) abtrennen liessen. Die Fr. 17–22 gaben aus Me-Ae 173 mg reine Subst. C, Smp.  $250\text{--}260^\circ$ . Die ML (2,1 g) wurden an einer  $\text{SiO}_2$ -Säule nach DUNCAN [16] chromatographiert, vgl. Tab. 12.

<sup>37)</sup> Verwendet wurde Celite 545, ein Produkt der JOHNS-MANVILLE, INTERNATIONAL CORP. New York, bezogen von der Firma SCHNEIDER & Co., Winterthur.

<sup>38)</sup> Man erhält eine Lösung, die Alk und W im Verhältnis 1:1 enthält.

Tabelle 12. *Chromatographie von 2,1 g Fr. 17–22 von Tab. 11 an 800 g SiO<sub>2</sub> nach DUNCAN*  
 Tropfgeschwindigkeit 56 Tropfen pro Min., entsprechend 35–40 ml pro Fr. und 20 Min. Eluiert  
 wurden Fr. 1–152 mit Be-Isopropanol-(93:7), Fr. 153–395 mit Be-Isopropanol-(69:31) und die  
 Fr. 396–537 mit reinem Isopropanol

Fr. Nr.	Eindampfdruckstand			Kristalle oder reine Stoffe			
	Gewicht in mg	KEDDE- reaktion	Flecke im Pchr.	Gewicht in mg	Pchr.	Smp.	Kristalli- siert aus
1–152	80	–	–	–	–	–	–
153–168	55	–	–	–	–	–	–
169–175	25	+	A <sub>1</sub>	25	A <sub>1</sub>	–	amorph
176–182	174	+	A <sub>1</sub> , A	–	–	–	–
183–187	256	+	A	106	A	140–145°	An-Ae
188–194	141	+	A, A <sub>2</sub>	31	A	138–145°	An-Ae
195–223	178	+	A <sub>2</sub> , B <sub>1</sub> , (D')	–	–	–	–
224–237	49	+	A <sub>2</sub> , B <sub>1</sub> , (D'), E	–	–	–	–
238–242	33	+	A <sub>2</sub> , B <sub>1</sub>	–	–	–	–
243–261	103	+	A <sub>2</sub> , B, C, G	–	–	–	–
262–316	225	+	B, C	42	C	226/ 247–252°	Me-Ae
317–395	82	+	B, C, E	–	–	–	–
396–468	54	+	B, (D)	–	–	–	–
469–537	157	+	B, (D)	–	–	–	–

b) *Untersuchung der Chf-Alk-(2:1)-Extrakte.* – *Vorversuch (1F).* 6,8 g Chf-Alk-(2:1)-Extr., 2,9 g Strophanthiobiase, 30 ml Citratpuffer [39] vom pH 5,2, 5 ml To und 100 ml W wurden zusammengegeben und unter CO<sub>2</sub> 6 Tage bei 37° stehengelassen. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei den dünnen Zweigen. Das Ausschütteln, 6mal mit je 150 ml Chf, 10mal mit je 100 ml Chf-Alk-(9:1) und 9mal mit je 100 ml Chf-Alk-(2:1) gab die in Tab. 5 genannten Ausbeuten an 1F-Extrakten. Die Glucosebestimmung nach BERTRAND [38] gab 0,53 g (= 7,8%) reduzierendes Material, vgl. auch Tab. 5. 1,4 g des Chf-Extr.-1F wurden an 42 g Mg-silicat-Celite-(2:1)-Gemisch [20] chromatographiert. Die mit Chf-Me-(97:3) eluierten Anteile (173 mg) gaben aus Me-Ae 27 mg Subst. C (= 16-Dehydrostrophanthidin) in Prismen vom Smp. 250–259°. Fr. 13–26 (416 mg) wurden nochmals an 23 g SiO<sub>2</sub> chromatographiert, es liessen sich jedoch keine Kristalle isolieren. Es wurden daher keine weiteren Trennungsversuche unternommen.

*Hauptversuch (2F): Fermentation mit Strophanthiobiase.* 70 g Chf-Alk-(2:1)-Extr. wurden in 2 l W gelöst und 300 ml Citratpuffer [39] pH 5,2, 5 ml To und 10 g Strophanthiobiase-Präparat zugegeben. Darauf wurde 7 Tage unter CO<sub>2</sub> bei 37° fermentiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie schon beschrieben. Ausgeschüttelt wurde 7mal mit je 400 ml Chf, 5mal mit je 400 ml Chf-Alk-(9:1) und 23mal mit je 400 ml Chf-Alk-(2:1). Ausbeuten vgl. Tab. 6. Der Zuckeranteil, bestimmt mit FEHLING'scher Lösung [38], entsprach 2,5 g (3,6%) Glucose, vgl. auch Tab. 6.

*Hauptversuch (3F): Fermentation mit Pilzamylose.* Die 53 g Chf-Alk-(2:1)-Extr.-2F (vgl. Tab. 6) wurden in 1,8 l W gelöst und 500 ml Acetatpuffer (0,01 N NaOAc-HOAc, pH 5,0, + 0,05 M NaCl) [41], 70 g Pilzamylose und 2 ml To zugegeben. Die Suspension fermentierte 2 Tage unter CO<sub>2</sub> bei 37°. Während der ersten Std. der Fermentation wurden alle 10–20 Min. jeweils 2 ml entnommen und mit FEHLING'scher Lösung [38] titriert. Zu beachten ist dabei, dass die Pilzamylose-Lösung allein bereits eine beträchtliche Menge FEHLING'scher Lösung verbrauchte, also reduzierende Zucker enthielt. Dieser Blindwert wurde bei den Bestimmungen abgezogen. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben. Ausgeschüttelt wurde 5mal mit je 400 ml Chf, 8mal mit je 300 ml Chf-Alk-(9:1) und 8mal mit je 300 ml Chf-Alk-(3:2). Die Bestimmung der reduzierenden Bestandteile ergab am Schluss einen Wert entsprechend 9,8 g = 18,3% Glucose (vgl. Tab. 6).

*Chromatographie der fermentierten Auszüge* (vgl. Tab. 7). – *Chromatographie 1.* 15 g Chf-Extr.-3F wurden an 450 g SiO<sub>2</sub> chromatographiert, vgl. Tab. 13.

Tabelle 13. *Chromatographie von 15 g Chf-Extr.-3F an 450 g SiO<sub>2</sub>*

Fr. Nr.	Lösungsmittel 1,5 l pro Fr.	Eindampfrückstand					Weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle			
		Menge in mg	Flecke im Pchr.	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr.	
1-3	Chf-Be-(9:1)	548	–	–	–	–	–
4	Chf	47	A <sub>1</sub> , A	–	–	–	–
5-6	Chf-Me-(98:2)	5720	A <sub>1</sub> , A, (E), (G), (J)	590	258–264°	C	Chromat. 1a
7	Chf-Me-(98:2)	1660	A, C, D, (E), (G), (J)	27	258–264°	C	–
8	Chf-Me-(98:2)	166	A, C, D, E, G, H, J, K	–	–	–	Verteilungs- Chromat. 3
9	Chf-Me-(98:2)	130		–	–	–	
10	Chf-Me-(9:1)	300	–	–	–	–	
11	Chf-Me-(9:1)	1200	A, C, D, E, G,	–	–	–	Chromat. 1b
12	Chf-Me-(9:1)	131	H, J, K	–	–	–	Verteilungs- Chromat. 3
13	Chf-Me-(4:1)	130	}	–	–	–	Chromat. 3
14	Chf-Me-(1:1)	80		–	–	–	–

*Chromatographie 1a.* Die Fr. 5 und 6 von Tab. 13 (zusammen 5,72 g) wurden nochmals an 150 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Akt. III) in 32 Fr. aufgetrennt. Die Fr. 5-6 [884 mg, eluiert mit Chf-Be-(9:1)] gaben aus Me-Ae 250 mg Subst. C in farblosen Prismen, Smp. 254–257°. Die Fr. 15–31 (2,2 g) dienen zur Verteilungschromatographie, Tab. 15. Die übrigen Eluate wurden nicht weiter getrennt.

*Chromatographie 1b.* Fr. 11 von Tab. 13 (1,2 g) wurde ebenfalls an 36 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Akt. II) chromatographiert. Die dabei erhaltene Fr. 10 (16 mg, eluiert mit Chf-Me-(99:1)) gab aus Me-Ae 10 mg krist. Subst. C. Die übrigen Eluate kristallisierten nicht und wurden nicht weiter getrennt.

*Chromatographie 2.* 12 g Chf-Alk-(9:1)-Extr.-2F + 3F wurden an 400 g SiO<sub>2</sub> chromatographiert, vgl. Tab. 14.

Tabelle 14. *Chromatographie von 12 g Chf-Alk-(9:1)-Extr.-2F + 3F an 400 g SiO<sub>2</sub>*

Fr. Nr.	Lösungsmittel 1,2 l pro Fr.	Eindampfrückstand					Weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle			
		Menge in mg	Flecke im Pchr.	Menge in mg	Smp.	Pchr.	
1-2	Chf-Be-(9:1)	360	–	–	–	–	–
3-5	Chf	440	–	–	–	–	–
6-8	Chf-Me-(99:1)	847	A <sub>1</sub> , A, C	80	256–259°	C	–
9-12	Chf-Me-(98:2)	2224	A, C, D, H, J	12	256–259°	C	Verteilungs- Chromato- graphie 3
13-16	Chf-Me-(96:4)	1778	(A), (C), D, G, H, J, K	–	–	–	–
17-20	Chf-Me-(94:6)	404	D, G, H, J, K	–	–	–	–
21-24	Chf-Me-(9:1)	2662	H, J, K	–	–	–	–
25-27	Chf-Me-(1:1) bis Me	2654	J, K	–	–	–	–

*Chromatographie 3, Verteilung.* Von Chromatographie 1 (Tab. 13) wurden Fr. 8–10 (596 mg) und Fr. 12–14 (341 mg), von Chromatographie 2 (Tab. 14) Fr. 9–24 (7068 mg) und von Chromatographie 1a Fr. 15–31 (2200 mg) zusammengegeben, man erhielt total 10,2 g. Sie wurden auf 1,5 kg Kieselgur, das mit 1,5 kg W beladen war, gegeben [10b]. Das Kieselgur war wie üblich behandelt und gereinigt und wurde mit 1,5 kg W vermischt in die Säule gepackt. Tab. 15 orientiert über die Resultate.

*Chromatographie 3a.* Die Fr. 9–16 von Tab. 15 (152 mg) wurden zur Reinigung nochmals an 7,5 g SiO<sub>2</sub> chromatographiert, wobei sich zunächst etwas KEDDE-negatives Material abtrennen liess. Die mit Chf und Chf-Me-(99:1) eluierten Anteile stellten das reinste Präparat von Subst.  $\alpha$  dar, liessen sich aber nicht kristallisieren.

*Chromatographie 3b.* Die Fr. 40–46 von Tab. 15 (30 mg) wurden ebenfalls an 1,2 g SiO<sub>2</sub> chromatographiert, wobei sich ca. 20 mg KEDDE-negatives Material abtrennen liess. Die mit Chf-Me-(9:1) eluierten Anteile (4 mg) waren ein farbloser Schaum, der im Papier nur den Fleck von Subst.  $\gamma$  zeigte.

*Chromatographie 3c.* Die Fr. 67–80 von Tab. 15 (551 mg) wurden an 200 g feinem SiO<sub>2</sub> mit Be-Isopropanol-Gemischen nach DUNCAN [16] chromatographiert (Tab. 16). Zur Kontrolle der Fr. diente die Dünnschichtchromatographie.

*Chromatographie 3d.* Die Fr. 81–124 von Tab. 15 (zusammen 1,2 g) wurden an 400 g SiO<sub>2</sub> nach DUNCAN in 330 Fr. getrennt. Zum Eluieren diente reines Mek. Tropfgeschwindigkeit 30 ml

Tabelle 15. *Verteilungschromatographie an Wasser auf Kieselgur* (Tropfgeschwindigkeit 150 ml/Std., 450 ml/Fr.)

Fraktion	Lösungsmittel	Eindampfdruckstand		Kristalle			Weitere Verarbeitung
		Menge in mg	Flecke im Papierchromatogramm	Menge in mg	Smp. in °C	Flecke im Pchr.	
1–8	Be/W	350	KEDDE-negativ	–	–	–	–
9–16	Be/W	152	$\alpha$	–	–	–	Chromatographie 3a
17–18	Be/W	22	$\alpha, \beta$	–	–	–	–
19–29	Be/W	63	$\alpha, \beta, \gamma$	–	–	–	–
30–39	Be/W	81	$\beta, \gamma$	–	–	–	–
40–46	Be/W	30	$\gamma$	–	–	–	Chromatographie 3b
47–48	Be-Bu-(9:1)/W	446	$\gamma, A$	–	–	–	–
49–53	Be-Bu-(9:1)/W	2912	A, C	793	141–147	A	–
54–57	Be-Bu-(9:1)/W	495	A, C	96	252–258	C	–
58–61	Be-Bu-(9:1)/W	273	A, C, B, E	–	–	–	–
62–66	Be-Bu-(9:1)/W	393	A, C, E, D', G	–	–	–	–
67–69	Be-Bu-(9:1)/W	177	E, D', G, D	–	–	–	Chromatographie 3c an
70–73	Be-Bu-(9:1)/W	279	E, D', G, H	–	–	–	DUNCAN-
74–80	Be-Bu-(9:1)/W	110	D', G, H	–	–	–	Säule, Tab.16
81–87	Be-Bu-(9:1)/W	85	H, F	–	–	–	Chromatographie 3d
88–99	Be-Bu-(9:1)/W	206	H, F, H <sub>1</sub>	–	–	–	an DUNCAN-
100–113	Be-Bu-(4:1)/W	251	H, F, H <sub>1</sub>	–	–	–	Säule
114–119	Be-Bu-(4:1)/W	574	H, F und polarere Substanzen	–	–	–	–
120–124	Be-Bu-(4:1)/W	461	H, F und polarere Substanzen	–	–	–	–
125–140	Be-Bu-(1:1)/W	612	H, F und polarere Substanzen	–	–	–	–
141–142	Be-Bu-(1:1)/W	315	J	30	237–247	J	–
143–144	Be-Bu-(1:1)/W	427	J, K	–	–	–	–
145	Be-Bu-(1:1)/W	190	J, K	20	262–268	K	–
146–150	Be-Bu-(1:1)/W	276	K, L, M <sub>1</sub> , M, N	–	–	–	–
151–173	Be-Bu-(1:1)/W	835	M, N, P	–	–	–	–
174–176	Me	600	KEDDE-negativ	–	–	–	–

Tabelle 16. *Chromatographie 3c von 551 mg Fr. 67–80 von Tab. 15 nach DUNCAN an 200 g SiO<sub>2</sub>. Tropfgeschwindigkeit 30 ml pro Std. und Fr.*

Fr. Nr.	Lösungsmittel	Eindampfrückstand				
		roh		Kristalle		
		Menge in mg	Flecke im Pchr.	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr.
1–25	Be-Iso (69:31)	17	–	–	–	–
26–36	Be-Iso (69:31)	70	D'	–	–	–
37–43	Be-Iso (69:31)	31	D', G	–	–	–
44–50	Be-Iso (69:31)	81	G	–	–	–
91–110	Be-Iso (55:45)	38	E	4	175–183/ 252–262°	E
111–120	Be Iso (55:45)	15	E, D	–	–	–
121–162	Be-Iso (30:70)	131	D	–	–	–
163–170	Iso	20	((D))	–	–	–
171–175	Mc	100	–	–	–	–

pro Std. bei 10 ml pro Fr. Die Fr. 73–92 (114 mg) gaben aus Me-Ae 32 mg krist. Subst. H in farblosen Nadeln, Smp. 226–237°. Die anderen Eluate wurden nicht weiter getrennt.

c) *Orientierende Untersuchung des Chf-Alk-(3:2)-Extr. – 1. Milde saure Hydrolyse mit 0,05N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [13b].* 62 mg Chf-Alk-(3:2)-Extr., der ca. 50% KEDDE-negatives Material enthält, wurden in 10 ml Me gelöst und mit 10 ml 0,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt, dann 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Hierauf wurde mit 5 ml W verdünnt und das Me im Vakuum abdestilliert. Die verbleibende wässrige Lösung wurde 30 Min auf 65° erwärmt, abgekühlt und viermal mit Chf ausgeschüttelt. Man erhielt 5 mg Rohextrakt, der nach Pchr. (System Chf-Fmd) die Substanzen A, B, C und H enthielt. Nach Neutralisation mit BaCO<sub>3</sub> und Untersuchung im Pchr. (System Mek-To-(1:1)/W) liess sich in der wässrigen Restlösung Digitoxose nachweisen.

*2. Fermentation mit Schneckenferment [21].* Die neutrale, wässrige Restlösung, die noch Glucoside und Rhamnoside enthielt, wurde mit 60 mg Schneckenferment, 20 ml Acetatpuffer (0,1N AcOH-AcONa, pH 5,4) und 1 ml To versetzt und 4 Tage lang bei 38° fermentiert. Nach Entfernung des Ferments durch Füllen mit abs. Alk wurde mit Chf und Chf-Alk-(3:2)-Gemischen ausgeschüttelt. Die wie üblich gewaschenen und getrockneten Auszüge gaben 8 mg (= 13%) Chf-Extr. und 10 mg (= 16%) Chf-Alk-(3:2)-Extr. Die restlichen 39 mg blieben teilweise im KHCO<sub>3</sub>-Waschwasser, das KEDDE-negativ, aber stark gelb gefärbt war, oder im wässrigen Auszug zurück.

*3. Energische saure Hydrolyse mit KILIANI-Mischung [22].* 5 mg Chf-Alk-(3:2)-Extr. aus Versuch 2 wurden mit KILIANI-Mischung (3,5 ml AcOH, 5,5 ml W und 1 ml HCl konz.) gespalten. Im Pchr. (System Bu/W) konnte Rhamnose nachgewiesen werden. Glucose war nur noch schwach sichtbar.

**4. Beschreibung der isolierten Stoffe** (vgl. auch Tab. 9). – Farbreaktionen mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vgl. Tab. 10, UV.-Spektren in Alk vgl. Fig. 11, 12 und 13, relative Laufstrecken im Pchr. (Rf-Werte) Fig. 3–8 (Tab. 3), IR.-Spektren Fig. 14–16.

*Substanz α.* Dieser Stoff (total 68 mg) konnte sowohl direkt als auch nach Fermentation aus den Chf-Extr. gewonnen werden. Trotz mehrfacher Chromatographie gelang es nicht, ihn frei von KEDDE-negativem Material zu erhalten und zu kristallisieren. Im Pchr. System Chf/Fmd und Be-Chf-(7:5)/Fmd war zunächst nur ein Fleck sichtbar, der die gleiche Laufstrecke wie Digitoxigenin hatte. Nach einiger Zeit zeigte das Präparat noch einen zweiten Fleck, der wie 3-*epi*-Digitoxigenin lief. Auch durch Animpfen mit diesen Substanzen konnte keine Kristallisation erreicht werden.

*Substanz  $\gamma$ .* 4 mg dieser Substanz konnten amorph, aber pchr. rein nach Fermentation und Verteilung (3) erhalten werden.

*Substanz  $A_1$ .*  $A_1$  war in den Chf-Extr. vor und nach der Fermentation enthalten. 25 mg wurden aus den ursprünglichen Chf-Extr. nach Pchr. rein, aber amorph erhalten. Substanz  $A_1$  konnte mit 16 $\beta$ -Acetoxystrophanthidin identifiziert werden [23].

*Substanz A.* Aus den Chf-Auszügen vor und nach der Fermentation und aus den Chf-Alk-(9:1)-Extr. erhielt man insgesamt 795 mg krist. A (= Strophanthidin). Umkristallisieren aus An-Ae gab farblose Nadeln vom Smp. 136–144°/217–226°;  $[\alpha]_D^{22} = +40,8^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,00$  in Me). Nach Misch-Smp., Farbreaktion mit 84-proz.  $H_2SO_4$ , Drehung, sowie Laufstrecken in Pchr. und auf der Dünnschichtplatte war A identisch mit Strophanthidin.

*Substanz C.* Insgesamt wurden 1393 mg C aus den unter Substanz A erwähnten Auszügen in Kristallen gewonnen. Nach Umkristallisieren aus Me-Ae erhielt man farblose Prismen vom Smp. 226°/253–262°.  $[\alpha]_D^{26} = +82,4^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,70$  in Me-W-(1:1)). Substanz C war sehr schwer löslich in Me, An, Chf; schwer löslich in Me-W-(1:1) und gut löslich in Chf-Me-(1:1). C konnte als 16-Dehydrostrophanthidin erkannt werden [23]. Trocknung zur Analyse 5 Std. bei 0,01 Torr und 90° über  $P_2O_5$  (Schweinchen) gab 1,26% Gewichtsverlust.



*Substanz D.* 111 mg konnten aus der Chromatographie 3c amorph, aber pchr. rein erhalten werden. Sie stellt das  $\beta$ -D-Digitoxosid der Substanz C dar [23].

*Substanz D'.* 70 mg D' konnten aus der Chromatographie 3c amorph, aber papierchromatographisch rein erhalten werden. Die niedrige Extinktion im UV. (Tab. 9) zeigt, dass das Produkt noch erhebliche Mengen KEDDE-negatives Material enthalten hatte.

*Mikrohydrierung.* 10,78 mg Subst. D' wurden in 2 ml AcOH mit 20 mg  $PtO_2$  hydriert. Die Wasserstoffaufnahme nach 4 Std. betrug 0,243 ml (umgerechnet auf 0° und 760 Torr.) Für ein geschätztes MG. von 402 entspricht dies einer Aufnahme von 0,405 Mol.  $H_2$ . Zu berücksichtigen ist hierbei, dass das verwendete Präparat von Subst. D' amorph war und noch KEDDE-negatives Material enthielt. Das amorphe, farblose Hydrierungsprodukt gab mit KEDDE-Reagens keine Färbung mehr und zeigte im UV. nur noch ein kurzweiliges Maximum (siehe Tab. 9), das von einer isolierten Doppelbindung herrühren dürfte. Die zu geringe Extinktion dürfte von den Verunreinigungen kommen, die in dem verwendeten Präparat von Subst. D' enthalten waren.

*Substanz E* konnte aus Fr. 91–110 der Chromat. 3c kristallin erhalten werden. Aus Me-W erhielt man 4 mg gut ausgebildete, farblose Prismen vom Smp. 175–183°/252–262°, diese erwiesen sich jedoch als ein Gemisch von 16-Dehydrostrophanthidol und einem Digitoxosid, das sich von einem unbekanntem Genin ableitet [23]. Diese zwei Stoffe scheinen in den verwendeten Systemen sehr ähnliche Laufstrecken zu besitzen.

*Substanz G.* 81 mg konnten ebenfalls aus der Chromatographie 3c (Fr. 44–90) nach Pchr. rein, aber amorph gewonnen werden. Die Substanz zersetzte sich nach einiger Zeit. Nach erneuter Chromatographie war G wieder papierchromatographisch einheitlich und wurde acetyliert. Auch das Acetylderivat konnte nicht kristallisiert werden.

*Mikrohydrierung.* 8,28 mg Subst. G wurden mit 16 mg Pt-oxid in 2 ml AcOH 12 Std. bei 20° hydriert. Die Wasserstoffaufnahme erfolgte zunächst schnell, dann langsam. Aufnahme total 0,540 ml (umgerechnet auf 0° und 760 Torr). Für ein geschätztes MG. 514 entspricht dies 1,5 Mol.  $H_2$ . Das Hydrierungsprodukt war ein orange gefärbtes Harz, auf der Dünnschichtplatte gab es mehrere Flecke. Offenbar war Zersetzung eingetreten.

*Substanz H.* Substanz H wurde aus Chromatographie 3d gewonnen. Man erhielt insgesamt 32 mg Nadeln in Büscheln aus Me-Ae vom Smp. 233–237°.  $[\alpha]_D^{24} = +50,1^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,87$  in abs. Alk). Nach Smp., Misch-Smp., Drehung, Farbreaktionen mit 84-proz.  $H_2SO_4$ ,  $SbCl_3$  und  $H_3PO_4$ , Laufstrecken in Pchr., und auf der Dünnschichtplatte war H identisch mit Strophadogenin = 16 $\beta$ -Hydroxystrophanthidin [24] [25].

*Acetylierung.* 3 mg Substanz H, 0,1 mg abs. Py und 0,01 ml  $Ac_2O$  wurden 2 Tage bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 2,9 mg Rohprodukt. Aus Me erhielt man Nadeln vom Smp. 233–237°. Das Acetat war nach Smp., Misch-Smp., Farbreaktionen und Laufstrecken im Pchr. (System Be-Chf-(7:5)/Fmd, vgl. Fig. 7) identisch mit 3,16-Di-O-acetyl-16 $\beta$ -hydroxystrophanthidin [24] [25].

*Desacetylierung.* 1 mg 3,16-Di-O-acetyl-16 $\beta$ -hydroxystrophanthidin wurde in An gelöst und auf 200 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, neutral, Akt. I gegeben. Nach 41 Std. wurde mit Chf erschöpfend eluiert und der Eindampfrückstand im Pchr. untersucht. Es waren zwei Flecke sichtbar, die Laufstrecken entsprachen 3-O-Ac-C (= 3-O-Acetyl-16-dehydrostrophanthidin) sowie unverändertem Ausgangsmaterial.

*Substanz J.* 30 mg lieferte Fr. 142 von Tab. 15, aus Me erhielt man farblose Nadeln vom Smp. 237–247°.  $[\alpha]_D^{21} = +2,2^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,00$  in Me). Nach Smp., Misch-Smp., Farbreaktionen mit 84-proz. und konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (tiefrote Färbung gleich zu Anfang), Drehung und Laufstrecke im Pchr. war Substanz J identisch mit Convallatoxin. Die energische saure Hydrolyse mit KILIANI-Mischung gab nach Pchr. einen Zucker, der mit Rhamnose identisch war.

*Substanz K.* 20 mg krist. Substanz K erhielt man aus Fr. 144 der Verteilung (Tab. 15). Sie kristallisierte aus Me-Ae in farblosen Nadeln, die zu kleinen Sternen vereinigt waren, Smp. 262–268°.  $[\alpha]_D^{21} = -13,4^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,05$  in Me). 2 mg K wurden mit 0,1 ml KILIANI-Mischung hydrolysiert [22]. Der erhaltene Zucker zeigte im Pchr. eine Laufstrecke entsprechend Rhamnose.

Die Analysen wurden von Herrn E. THOMMEN im Mikrolabor des Institutes ausgeführt.

#### SUMMARY

Six crystalline (A, C, E, H, J and K) and six amorphous ( $\alpha$ ,  $\gamma$ , A<sub>1</sub>, D, D', and G) but paperchromatographically homogenous cardenolides were isolated from the wood of *Parquetina nigrescens* (AFZEL.) BULLOCK (= *Periploca nigrescens* AFZEL.) after fermentation with glucosidases. The presence of twelve more cardenolides was observed in paperchromatograms. Three of the mentioned compounds could be identified with known substances: A = strophanthidin (already isolated by SCHENKER *et al.* [3] from similar material), H = strophadogenin = 16 $\beta$ -hydroxystrophanthidin and J = convallatoxin. A<sub>1</sub>, C, D, E and K are new compounds whose structures will be reported in the following publication. The structures of  $\alpha$ ,  $\gamma$ , D' and G are as yet unknown.

Institut für Organische Chemie  
der Universität Basel

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 269. Mitt.: T. REICHSTEIN, Chemische Rassen in *Acokanthera*, *Planta Medica* (im Druck)
- [2] A. A. BULLOCK, *Kew Bulletin* 15, 193 (1961).
- [3] E. SCHENKER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 1004 (1954).
- [4] R. MAULI & CH. TAMM, *Helv.* 40, 299 (1957).
- [5] P. R. O. BALLY, K. MOHR & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 1740 (1951); 35, 45 (1952).
- [6] J. SCHMUTZ & T. REICHSTEIN, *Pharmaceut. Acta Helv.* 22, 359 (1947).
- [7] D. L. KEDDE, Diss. Leyden 1946; *Pharmac. Weekblad* 82, 741 (1947); Ausführung nach I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.* 52, 643 (1952).
- [8] R. TSCHESCHE & G. GRIMMER, *Chem. Ber.* 93, 1477 (1960).
- [9] O. RENKONEN, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 42, 160 (1959).
- [10] a) O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 108 (1951); b) H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 36, 357 (1953).
- [11] E. SCHENKER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 680 (1954); B. FECHTIG, J. v. EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 43, 1570 (1960).
- [12] R. MAULI, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 40, 284 (1957).
- [13] a) R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 34, 2278 (1951); b) HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 42, 977 (1959).
- [14] A. KATZ & T. REICHSTEIN, *Pharmaceut. Acta Helv.* 22, 437 (1947).

- [15] E. STAHL, *Angew. Chem.* **73**, 646 (1961); E. STAHL & U. KALTENBACH, *J. Chromatogr.* **5**, 351 (1961); vgl. auch M. BARBIER, HORST JÄGER, H. TOBIAS & E. WYSS, *Helv.* **42**, 2440 (1959).
- [16] G. R. DUNCAN, *J. Chromatogr.* **8**, 37 (1962).
- [17] A. GAMP, P. STUDER, H. LINDE & K. MEYER, *Experientia* **18**, 292 (1962).
- [18] K. B. JENSEN, *Acta pharmacol. toxicol.* **9**, 99 (1953); K. B. JENSEN & K. TENNOE, *J. Pharmacol.* **7**, 334 (1955); J. H. RUSSEL, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **43**, 167 (1960).
- [19] K. MEYER, *Helv.* **29**, 718 (1946).
- [20] K. DOBRINER, S. LIEBERMANN & C. P. RHOADS, *J. biol. Chemistry* **172**, 241 (1948).
- [21] P. KARRER, B. JOOS & M. STAUB, *Helv.* **6**, 800 (1923), Präparat bereitet nach H. HUBER, F. BLINDENBACHER, K. MOHR, P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 46 (1951).
- [22] H. KILIANI, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **63**, 2866 (1930), Ausführung nach P. R. O. BALLY, K. MOHR & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 1740 (1951).
- [23] R. BERTHOLD, W. WEHRLI & T. REICHSTEIN, folgende Mitteilung, *Helv.* **48**, 1659 (1965).
- [24] H. ROSENMUND & T. REICHSTEIN, *Pharmaceut. Acta Helv.* **17**, 176 (1942).
- [25] J. PITRA & Z. ČEKAN, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* **26**, 1551 (1961); J. PITRA, J. MOURAL & Z. ČEKAN, *ibid.* **27**, 2985 (1962).
- [26] V. ARREGUINE & P. E. PASQUALIS, *Rev. Univ. nac. Cordoba* **32**, 439 (1945); M. PESEZ, *Ann. pharmac. franç.* **10**, 104 (1952).
- [27] F. FEIGL, «Spot Tests», Vol. II, *Organic Applications*, p. 289, 4. Aufl., Elsevier Publishing Co., Amsterdam 1954.
- [28] A. PETIT, M. PESEZ, P. BELLET & G. AMIARD, *Bull. Soc. chim. France* [5] **17**, 288 (1950); P. BELLET, *Ann. pharmac. franç.* **8**, 471 (1950).
- [29] A. KATZ & T. REICHSTEIN, *Pharmaceut. Acta Helv.* **19**, 231 (1944); W. A. JACOBS, *J. biol. Chemistry* **88**, 519 (1930).
- [30] W. KARRER, *Helv.* **12**, 506 (1929); R. TSCHESCHE & W. HAUPT, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **69**, 459 (1936); T. REICHSTEIN & A. KATZ, *Pharmaceut. Acta Helv.* **18**, 521 (1943).
- [31] J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* **37**, 883 (1948).
- [32] R. BÜHRER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **45**, 389 (1962).
- [33] TH. SOLACOLU & G. HERRMANN, *C. r. Séances Soc. biol.* **177**, 1138 (1934); A. STOLL & J. RENZ, *Helv.* **22**, 1193 (1939).
- [34] T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Faraday Soc.* **7**, 305 (1949).
- [35] M. T. KRAUSS, HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *J. Chromatogr.* **3**, 63 (1960).
- [36] S. M. PARTRIDGE, *Nature* **164**, 443 (1949).
- [37] A. P. MACLENNAN, H. R. RANDALL & D. W. SMITH, *Analyt. Chemistry* **37**, 2020 (1959).
- [38] TOLLENS-ELSNER, «Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate», p. 92 (BERTRAND-Methode), 4. Aufl., J. A. Barth, Leipzig 1935.
- [39] F. W. KÜSTER, A. THIEL & K. FISCHBECK, «Logarithmische Rechentafeln», p. 147, W. de Gruyter & Co., Berlin 1955.
- [40] J. v. EUW, H. HESS, P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 1821 (1951).
- [41] M. L. CALDWELL & S. E. DOEBBELING, *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 1835 (1937).
-