

## 169. Die Biosynthese der Cardenolid- und Spirostan-Glykoside in *Digitalis lanata* EHRH. Vergleich der Bildungsraten

Glykoside und Aglykone, 274. Mitteilung<sup>1)</sup>

von J. v. EUW und T. REICHSTEIN

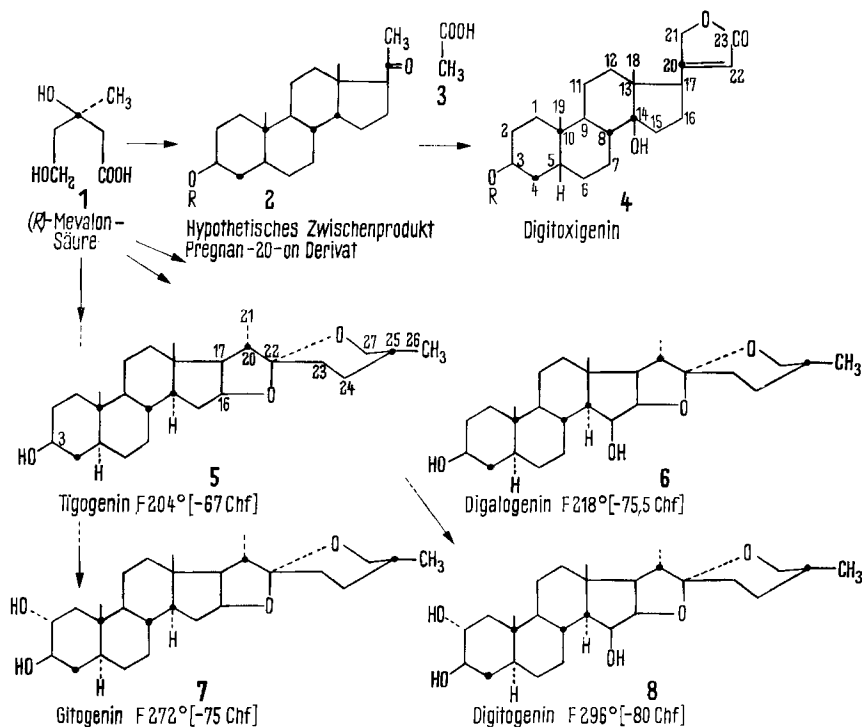
(1. V. 66)

Die Biosynthese des Digitoxigenins (4) in *Digitalis*-Pflanzen vollzieht sich wie bei anderen Steroiden über Mevalonsäure (1) [2], mit dem Unterschied, dass nicht alle seine 23 C-Atome aus Mevalonsäure (1) stammen [3] [4a], sondern nur C-1 bis C-21 [5] [4b, c] [6]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Stufe eines Pregnan-20-on-Derivats 2 durchlaufen wird, an das sich eine Molekel Essigsäure (3) kondensiert. Es ist bekannt, dass viele Vertreter der Gattung *Digitalis* ausser Cardenolid- auch Pregnan- (= «Digitanol»-)<sup>2)</sup> und besonders reichlich Spirostanol-Glykoside (Saponine) produzieren. Genau untersucht sind besonders die Saponine der Samen von *Digitalis purpurea* L. und *D. lanata* EHRH. ([11] und frühere Lit. daselbst), wobei für das Digitonin von TSCHESCHE & WULFF [12] kürzlich auch der Bau des Zuckeranteils abgeklärt werden konnte. Als Genine wurden Tigogenin (5), Digalogenin (6), Gitogenin (7) und Digtogenin (8) sowie ihre in 25-Stellung raumisomeren Begleiter nachgewiesen. Bei den letzteren handelt es sich nach TSCHESCHE *et al.* [11] nur teilweise um Artefakte. Die Samen von *D. lanata* enthielten keine Digitogeninglykoside; sonst waren bei den zwei *Digitalis*-Arten nur quantitative Unterschiede feststellbar. Es wird meistens angenommen, dass die Biosynthese der Spirostanole in der Pflanze analog wie die Steroidsynthese im tierischen Organismus [13] über Acetat, Mevalonsäure (1), Squalen, Lanosterol und Cholesterol oder ein ähnliches C<sub>27</sub>-Sterol verläuft ([14], weitere Lit. bei [15]). Radioaktiv markiertes Acetat sowie Mevalonsäure-[2-<sup>14</sup>C] werden in Kartoffeln und anderen Pflanzen in Solaninalkaloide [15] [16] sowie in N-freie Spirostanole [17] [18] eingebaut, wobei die Einbauraten oft sehr gering, bei Verabreichung von Mevalonsäure aber meist relativ höher waren als bei Verabreichung von Acetat. BENNETT & HEFTMANN [18] konnten kürzlich zeigen, dass Keimlinge von *Dioscorea spiculiflora* markiertes Cholesterol in Diosgenin und Kryptogenin überzuführen vermögen.

Bei unseren Versuchen [5] zur Kontrolle der Biosynthese des Digitoxigenins (4) hatten wir DL-Mevalonsäure-[3-<sup>14</sup>C] (Racemat von (1)) mit Hilfe der Dochtmethode an junge Pflanzen von *Digitalis lanata* verabreicht, wobei ein Stamm («A-Pflanzen») verwendet wurde, der fast keine Digoxigenin-Derivate, sondern vorzugsweise Digitoxigenin-Glykoside bildet. Analysiert wurden die Blätter. Aus 85 g trockenen

<sup>1)</sup> 273. Mitt. vgl. [1].

<sup>2)</sup> Der Name stammt von TSCHESCHE & BUSCHAUER [7a]. Formelübersicht vgl. v. EUW & REICHSTEIN [5] sowie TSCHESCHE [7b, c]. Ähnlich gebaute, teilweise sogar identische Pregnanderivate kommen in vielen Esterglykosiden der Asclepiadaceen vor, vgl. Fussnote 4 bei JAEggi *et al.* [8] sowie HEGNAUER [9], wo diese Stoffe allerdings noch als C-Nor-D-homo-pregnan-Derivate formuliert sind, was sich als unrichtig erwiesen hat [8] [10].



Blättern hatten wir nach Fermentierung die in Tab. 1 genannten Ausbeuten an rohen Extrakten gewonnen.

Tabelle 1. Ausbeuten an Rohextrakten aus 85 g getrockneten Blättern von *Digitalis lanata*, geerntet 21 Tage nach Verabreichung von total 0,256 mCi Mevalonsäure-[3-<sup>14</sup>C]-ammoniumsalz (= 568 320 000 dpm)

Art des Extraktes	Menge in g	Radioaktivität in dpm	
		pro mg	total
Petroläther- (Fette, Sterole usw.)	0,86	6540	5624 000
Chloroform- (vorw. Cardenolide)	3,5	8210	28735 000
Chf-Alkohol-(2:1) (vorw. Saponine)	0,81	9630	7800 000
Chf-Alkohol-(3:2) (vorw. Saponine)	1,27	12000	15240 000

Damals [5] wurde nur der Chloroformextrakt untersucht, der die Hauptmenge der Cardenolide enthielt. Wir beschreiben hier die Untersuchung der stärker polaren Anteile (Chloroform-Alkohol-Extrakte), die vor allem die Spirostanglykoside enthielten, daneben aber auch noch etwas stark polare Cardenolide, sowie andere Stoffe, der Chf-Alk-(3:2)-Extrakt auch freie Zucker. Nach Vorversuchen mit analogen Extrakten aus normalen Blättern wurde wie folgt verfahren.

Der Chf-Alk-(2:1)-Extrakt gab aus wenig Methanol 65 mg Kristalle, Smp. 280–288°. Es handelte sich um ein Saponingemisch, das nach saurer und alkalischer Hydrolyse 18 mg rohes krist. Geningemisch (hauptsächlich Tigogenin (5) mit wenig Gito-

genin (7)) lieferte, die mit der Hauptmenge zusammen getrennt wurden. Die amorphen Anteile des Chf-Alk-(2:1)-Extraktes wurden mit dem -(3:2)-Extrakt vereinigt und zunächst einer energischen sauren Hydrolyse mit KILIANI-Mischung<sup>3)</sup> unterworfen. Die nunmehr mit Chloroform-Äther leicht ausschüttelbaren Genine (1,029 g) waren noch mit etwas anhydrierten Cardenoliden, dunklen Chlorophyll-Zersetzungsprodukten usw. verunreinigt. Sie wurden zur Vorreinigung mit KOH in Methanol gekocht, worauf 415 mg gereinigtes Sapogeningemisch als farblose kristalline Masse resultierte. Es wurde mit den oben genannten 18 mg vereinigt und zweimal an SiO<sub>2</sub> chromatographiert, wobei sich die in Tab. 2 genannten Ausbeuten ergaben. Bei den Kristallen handelt es sich um Präparate, die (ausser bei Digalogenin) bis zum konstant bleiben-

Tabelle 2. Ausbeuten an isolierten Sapogeningenen in mg

Stoff (Präparat-Nr.)	Reine Kristalle					ML <sup>8)</sup> Total		
	Menge mg (Form)	Smp.	Rf <sup>4)</sup>	R <sub>II</sub> <sup>5)</sup>	Farbreaktionen mit <i>p</i> -Toluol- sulfon- säure <sup>6)</sup>		mg	mg
Tigogenin (5) (1243)	130 Dünne Nadeln	206–208°	0,79	1	braun UV. braungelb	blass citron	22	152
Digalogenin (6) (1270)	1 Blättchen	210–222°	0,66	0,91	gelbbraun → citron UV. leuchtend grüngelb	farblos	9,5	10,5
Gitogenin (7) (1244)	54,2 Wollige Nadeln	272–273°	0,39	0,49	braungelb UV. gelblich	violett	4,5	58,7
Digitogenin (8) (1245)	13,8 Wollige Nadeln	295–297°	0,33	0,41	braun UV. bläulich	farblos	20	33,8

den Smp. aus Chloroform-Äther-Pentan umkristallisiert worden waren und im Dünnschichtchromatogramm (Dchr) nur *einen* scharf begrenzten Fleck gaben. Die Identifizierung geschah durch direkten Vergleich mit authentischem Vergleichsmaterial<sup>9)</sup> nach Mischprobe und Dchr (inkl. Farbreaktionen). Trotzdem ist es möglich, dass die isolierten Präparate etwas von den 25 $\beta$ -Isomeren beigemischt enthielten, was aber für die vorliegende Studie unwesentlich ist. In Tab. 3 ist die Radioaktivität der vier

<sup>3)</sup> Gemisch von 35 ml Eisessig, 10 ml konz. HCl und 55 ml Wasser [19].

<sup>4)</sup> Absoluter Rf-Wert (Mittel von 3 Versuchen) im Dchr an Kieselgel H nach STAHL («MERCK»), Fließmittel: Isopropyläther-Cyclohexan-(2:1). Entwickelt durch Sprühen mit 20-proz. *p*-Toluolsulfonsäure in Alkohol und Erhitzen auf 110–130°.

<sup>5)</sup> Relativer Rf-Wert im Dchr, bezogen auf Tigogenin (5) im System wie erwähnt<sup>4)</sup>.

<sup>6)</sup> Färbung beim Entwickeln des Dchr wie angegeben<sup>4)</sup>.

<sup>7)</sup> Färbung beim Tüpfeln mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 20° auf weisser Porzellanplatte.

<sup>8)</sup> ML = eingedampfte Mutterlauge der Kristalle, enthielt im wesentlichen noch dasselbe Material.

<sup>9)</sup> Herrn Prof. R. TSCHESCHE, Bonn, danken wir auch hier für Überlassung von Digalogenin (6).

reinen Spirostanole angegeben. Zum Vergleich sind die zwei aus den gleichen Pflanzen früher isolierten Cardenolide auch in Tab. 3 aufgenommen.

Tabelle 3. *Radioaktivität der isolierten Genine*

Präp. Nr.	Stoff	Smp.	Menge in mg		Radioaktivität in dpm		Total für ganze Menge, inkl. ML
			rein	(inkl. ML)	per mg	per mMol	
1230	Digitoxigenin (4)	261–263°	115	(245)	9500	3 560 000	ca. 2 330 000
1231	Gitoxigenin	242–244°	27	(100)	8900	3 480 000	ca. 890 000
1243	Tigogenin (5)	206–208°	130	(152)	30000	12 500 000	ca. 4 560 000
1270	Digalogenin (6)	210–222°	1	(10,5)	8 530 <sup>10)</sup>	3 680 000	ca. 90 000
1244	Gitogenin (7)	272–273°	54,2	(58,7)	39400	17 000 000	ca. 2 310 000
1245	Digitogenin (8)	295–297°	13,8	(33,8)	18200	8 160 000	ca. 615 000
Für die 4 Spirostanole total							7 575 000

*Diskussion der Resultate.* Die zwei verarbeiteten Extrakte hatten zusammen eine totale Aktivität von 23040000 dpm. Wenn man annimmt, dass die Kristallmutterlaugen jeweils ungefähr dieselbe Aktivität besessen hatten wie die vier reinen Präparate, so ist in diesen vier Spirostanolen ca. 33% der ursprünglichen Aktivität erfasst.

Auffallend ist die hohe Aktivität der Sapogenine, besonders des Tigogenins (5) und des Gitogenins (7), im Vergleich zu den Cardenoliden. Wenn man annimmt, dass alle diese Stoffe ausschliesslich über Mevalonsäure, Squalen usw. entstanden sind, sollten die Spirostanole hier 6 markierte C-Atome enthalten, wie in den Formeln 5, 6, 7 und 8 angedeutet, gegenüber 5 solcher in den Cardenoliden (z. B. 4). Würde die relative Bildungsgeschwindigkeit (Bildung im Vergleich zur vorhandenen Menge am Anfang des Versuches) in beiden Stoffgruppen gleich sein, so sollten die Spirostanole pro Mol nur eine ca. 20% höhere Aktivität aufweisen als die Cardenolide. In Wirklichkeit ist sie beim Tigogenin ca. 3,5mal, beim Gitogenin ca. 5mal und beim Digitogenin noch ca. 2,3mal grösser. Es muss also angenommen werden, dass die jungen Pflanzen am Anfang des Versuches bereits relativ viel Cardenolide, aber relativ wenig Spirostanole enthalten haben und dass während der Versuchsperiode die Bildung der Spirostanole rascher erfolgte.

Über den Abbau der hier isolierten Spirostanole, zur Prüfung ob die Markierung den Erwartungen entspricht, wird später von TAMM und Mitarb. berichtet.

*Corrigendum.* In der früheren Mitteilung [5] wurden zwei sinnstörende Fehler übersehen: Seite 714, Zeile 4, soll es heissen: *sym.*-N,N-Dibenzyl-äthylendiamin (statt -diäthylamin). Seite 716, zweitunterste Zeile vom Text, soll es heissen: Keton XXVIII (statt XXXV).

Wir danken der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, auch hier für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit. Der Firma SANDOZ AG., Basel, im besondern den Herren Dr. J. RUTSCHMANN und Dr. E. ANGLIKER, danken wir für die Überlassung der Pflanzen, Herrn P. ACHERMANN für ihre

<sup>10)</sup> Näherungswert mit 0,4 mg bestimmt und daher mit relativ grosser Fehlermöglichkeit behaftet.

gärtnerische Betreuung und den Herren Dr. F. KALBERER und H. GALLIKER für die Bestimmung der Radioaktivität. Ferner danken wir Herrn Dr. EK. WEISS für seine Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

### Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Ausführung der KEDDE-Reaktion (Butenolide): [20], Xanthhydrol-Reaktion (2-Desoxyzucker): [21], FEIGL-Test (für Glucose usw.): [22]. Papierchromatogramme (Pchr) absteigend nach früherer Vorschrift [23] auf WHATMAN-Papier Nr. 1; bei Imprägnierung wurde mit genau 35% des Papiergewichts an ruhender Phase (Fmd oder W) getränkt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach KALBERER & RUTSCHMANN [24].

Es werden die folgenden *Abkürzungen* benützt: Ae = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Be = Benzol, Bu = *n*-Butanol, Chf = Chloroform, Cy = Cyclohexan, Di = Dioxan, Dchr = Dünnschichtchromatographie (-gramm), Eg = Äthylacetat, Fmd = Formamid, Fr. = Fraktion, Gem = Gemisch von Chf-Eg-Me-(1:1:1), Me = Methanol, ML = eingedampfte Mutterlauge, Pchr = Papierchromatographie (-gramm), Pe = Petroläther, To = Toluol, W = Wasser.

*Isolierung der Sapogenine aus Digitalis lanata nach Verabreichung von Mevalonsäure-[3-<sup>14</sup>C].* Die 810 mg Chf-Alk-(2:1)-Extrakt (Tab. 1 der früheren Mitt. [5]) gaben aus wenig Me 65 mg farblose feine Blättchen, Smp. 280–288° (Zers.); KEDDE-Reaktion –, FEIGL-Test +, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> farblos; löslich in Dioxan, wenig in Me, sehr schwer in An und Ae. Sie wurden wie die Hauptmenge (siehe unten) sauer und alkalisch hydrolysiert, worauf 18 mg farbloses krist. Geningemisch resultierten. Nach Dchr vorwiegend Tigogenin mit wenig Gitogenin vermischt. Es wurde mit der Hauptmenge getrennt (siehe unten).

Die ML obiger Kristalle (745 mg) enthielt noch etwas Cardenolide. Im Pchr. (Bu-To-(1:1)/W, 7 Std., Front 300 mm) waren 3 KEDDE-positive Flecke sichtbar mit Rf = 0,133 (Hauptfleck); 0,583 (schwach, ähnlich Gitoxin); 0,815 (schwach), ferner ein vierter Fleck mit Rf = 0,666, der mit KEDDE-Reagens nicht blau, sondern braun wurde.

Die 1,27 g Chf-Alk-(3:2)-Extr. (vgl. Tab. 1 der früheren Mitt. [5]) enthielten freie Zucker (reduzierten FEHLING'sche Lösung stark). Im Pchr (System wie oben) war mit KEDDE-Reagens nur ein schwacher Fleck mit Rf = 0,107 sichtbar.

Beide Teile wurden vereinigt (2,015 g) und mit 30 ml KILIANI-Mischung [19]<sup>3</sup>) 1½ Std. auf 100° erhitzt. Hierauf wurde im Vakuum auf 15 ml eingeeengt, mit 15 ml W versetzt und erneut auf 5 ml eingeeengt. Dann wurde 3mal mit je 50 ml Chf-Ae-(1:3) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden im Gegenstrom 1mal mit 5 ml W, 2mal mit je 3 ml 2N Sodälösung und noch 1mal mit 5 ml W gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Der schwarzgrüne Rückstand (1,02 g) wurde mit 1 g KOH in 20 ml Me 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Zugabe von 5 ml W wurde im Vakuum auf 5 ml eingeeengt und 3mal mit Chf-Ae-(1:3) ausgeschüttelt. Die mit W gewaschenen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 415 mg rohes Sapogeningemisch als fast farblose kristalline Masse. Es wurde mit den 18 mg Genin aus krist. Saponin vereinigt und das Ganze (430 mg) an 60 g Silicagel («MERCK», Korngrösse 0,05–0,2 mm) nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Über das Resultat orientiert Tabelle 4.

Die nicht getrennten Gemische von Gitogenin und Digitogenin (ML der Fr. 49–54, gesamte Fr. 55–58 und ML von Fr. 59–63), total 73 mg, wurden an 20 g SiO<sub>2</sub> nach DUNCAN [26] im System Isopropyläther-Cyclohexan-(1:1) getrennt.

Die Fr. 1–6 gaben 11 mg Eluat, amorph. Dchr (Isopropyläther-Cy-(2:1)) zeigte 5 Flecke, nicht weiter untersucht.

Die Fr. 7–9 (17,2 mg) gaben aus Chf-Ae 9 mg Gitogenin, Smp. 272–273°, und 3,7 mg von Smp. 266–272°.

Die Fr. 10 (4,2 mg) war nach Dchr ein Gemisch von Gitogenin und Digitogenin, das nicht getrennt wurde.

Die Fr. 11–15 (29,3 mg) gaben aus Chf-Ae-Pe 5,2 mg Digitogenin, Smp. 295–297°, und 4,1 mg vom Smp. 288–293°.

Die Fr. 16–23 (7,5 mg) lieferten keine Kristalle.

Die Totalausbeute ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 4. *Chromatographie von 430 mg radioaktivem Sapogeningemisch an 60 g SiO<sub>2</sub>*  
(Mengen in mg)

Fr. Nr.	Eluiermittel	Eindampfrückstand			
		Menge	Dchr <sup>11)</sup> R <sub>Ti</sub> <sup>5)</sup>	Kristalle Menge in mg	Art
1	Bc		ca. 0,86, UV. hell-		
2-5	Be-Ae-(99:1)	6	blau, bereits ohne		
	Be-Ae-(94:6)		Entwicklung		
6-11	Be-Ae-(92:8)		ca. 1,17, erst nach		
	Be-Ae-(80:20)	10	Entw. sichtbar		
12-18	Be-Ae-(80:20)	152	1	132	Tigogenin (5)
19-21	Be-Ae-(55:45)	10,2	Ein Fleck 0,69, direkt sichtbar	1	Digalogenin (6)
			2 Flecke 0,79 u. 0,91		
22-25	Bc-Ae-(55:45)	12,5	ca. 0,76	—	
26-32	Be-Ae-(55:45) und Ae(100%)	11,5	Ein Fleck 0,58, direkt sichtbar	—	
			Zweiter, langgezogener Fleck 0,45-0,79		
33-48	Ae-Gem-(99:1) Ae-Gem-(97:3)	15	Ein Fleck (schwach) 0,52, direkt, und zweiter Fleck 1,70, stark blau		
49-54	Ae-Gem-(96:4)	72	0,49	41,5	Gitogenin (7), ML für zweite Chromatogr.
55-58	Ae-Gem-(96:4)	22	0,41 und 0,49		krist. Gemisch für zweite Chromatogr.
59-63	Ae-Gem-(95:5)	15	0,41	4,5	Digitogenin (8) ML für zweite Chromatogr.
64-72	Ae-Gem-(90:10) Ae-Gem-(88:12) Ae-Gem-(40:60)	68	0,22-0,44 (schwach) 1,69 (fluoresc. bläulich)	—	nicht weiter untersucht
Total		394,2			

Die Kristallisation erfolgte: Tigogenin aus An-Ae-(1:5), feine Nadeln; Digalogenin aus Ae-Pe, farblose Blättchen; Gitogenin aus Chf-Ae, wollige Nadelchen; Digitogenin aus Chf-Ae-Pe, wollige Nadeln.

## SUMMARY

Young plants of *Digitalis lanata* were fed by the vick technique with ammonium mevalonate-[3-<sup>14</sup>C]. The isolation from the leaves of pure digitoxigenin and gitoxigenin (without dilution) was described formerly [5]. We describe here the isolation from the same plants of the four pure spirostanols: tigogenin (5), digalogenin (6), gitogenin (7) and digitogenin (8), again without dilution. These spirostanols contained about 3-5 times more radioactivity per Mol than the cardenolides.

Institut für Organische Chemie  
der Universität Basel

<sup>11)</sup> Ausführung auf Linienglas [25] an Silicagel H («MERCK»). Fließmittel: Isopropyläther-Cy (2:1). Entwicklung durch Sprühen mit 20-proz. *p*-Toluolsulfonsäure in Alkohol und Erhitzen auf 100-120°. Einige Fraktionen zeigten im UV. bereits vor der Entwicklung fluoreszierende Flecke, wie vermerkt.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] T. REICHSTEIN, Cardenolid- und Pregnanglykoside, *Naturwiss.* 1966, im Druck.
- [2] E. RAMSTAD & J. L. BEAL, *Chemistry & Ind.* 1960, 177.
- [3] H. GREGORY & E. LEETE, *Chemistry & Ind.* 1960, 1242.
- [4] E. G. GROS & E. LEETE, a) *Chemistry & Ind.* 1963, 698; b) *J. Amer. chem. Soc.* 87, 3479 (1965); c) E. LEETE, H. GREGORY & E. G. GROS, *ibid.* 87, 3475 (1965).
- [5] J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 47, 711 (1964).
- [6] R. TSCHESCHE & G. LILIENWEISS, *Z. Naturforsch.* 19b, 265 (1964).
- [7] a) R. TSCHESCHE & G. BUSCHAUER, *Liebigs Ann. Chem.* 603, 59 (1957); b) R. TSCHESCHE, *Angew. Chem.* 73, 727 (1961); *Bull. Soc. chim. France* 1965, 1219.
- [8] K. A. JAEGGI, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* 46, 694 (1963).
- [9] R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen* 3, 210–215 (1964), Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart.
- [10] H. MITSUHASHI & Y. SHIMIZU, *Steroids* 2, 373 (1963); H. MITSUHASHI, T. NOMURA & M. FUKUOKA, *ibid.* 4, 483 (1964).
- [11] R. TSCHESCHE, G. WULFF & G. BALLE, *Tetrahedron* 18, 959 (1962).
- [12] R. TSCHESCHE & G. WULFF, *Tetrahedron* 19, 621 (1963).
- [13] C. DJERASSI in E. MOSETTIG, Edit., *Biochemistry of Steroids*, Pergamon Press, Inc., New York 1958; G. POPJÁK & J. W. CORNFORTH, *The Biosynthesis of Cholesterol*, *Advances in Enzymol.* 22, 281–335 (1960); E. STAPLE in P. BERNFELD, Edit., *Biosynthesis of Natural Compounds*, Pergamon Press, Inc., New York 1963; H. H. RICHARDS & J. B. HENDRICKSON, *The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins*, W. A. Benjamin, Inc., New York 1964.
- [14] E. HEFTMANN, *Biochemistry of Plant Steroids*, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 14, 225 (1963); D. D. DAVIS, J. GIOVANELLI & T. A. P. REES, *Plant Biochemistry*, Blackwell Scientific Publ., Oxford 1964.
- [15] G. WILLUHN, *Die Biogenese pharmazeutisch wichtiger Pflanzenstoffe*, *Pharmaz. Ztg.* 110, 96–106 (1965).
- [16] H. SANDER & H. GRISEBACH, *Z. Naturforsch.* 13b, 755 (1958); A. R. GUSEVA, V. A. PASESHNICHENKO & M. G. BORIKHINA, *Biochimiya* 26, 723 (1961); *Chem. Abstr.* 56, 10591h (1962), A. R. GUSEVA & V. A. PASESHNICHENKO, *Biochimiya* 27, 853 (1962); *Chem. Abstr.* 58, 8240 g (1963).
- [17] E. HEFTMANN, R. D. BENNETT & J. BONNER, *Arch. Biochem. Biophysics* 92, 13 (1961); R. D. BENNETT, E. HEFTMANN, W. H. PRESTON & J. R. HAUN, *ibid.* 103, 74 (1963).
- [18] R. D. BENNETT & E. HEFTMANN, *Phytochemistry* 4, 577 (1965).
- [19] H. KILIANI, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 63, 2866 (1930).
- [20] D. L. KEDDE, *Pharmac. Weekbl.* 82, 741 (1947); I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.* 52, 643 (1952).
- [21] M. PESEZ, *Ann. pharmaceut. franç.* 10, 104 (1952), u. frühere Lit. daselbst.
- [22] F. FEIGL, *Spot Tests in Organic Analysis*; translated by R. E. OESPER; sixth, enlarged and revised Engl. Ed., Elsevier Publ. Co., Amsterdam, London, New-York, Princeton 1960, p. 426. Vgl. O. FREHDEN & L. GOLDSCHMIDT, *Mikrochim. Acta* 2, 184 (1937).
- [23] a) O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 108 (1951); b) H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 36, 357 (1953); c) E. SCHENKER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 680 (1954); d) F. KAISER, *Chem. Ber.* 88, 556 (1955).
- [24] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Helv.* 44, 1956 (1961).
- [25] A. GAMP, P. STUDER, H. LINDE & K. MEYER, *Experientia* 18, 292 (1962).
- [26] G. R. DUNCAN, *J. Chromatogr.* 8, 37 (1962).
-