

**197. Die Glykoside der Blätter von *Isoplexis canariensis* (L.) G. DON<sup>1)</sup>**2. Mitteilung<sup>2)</sup>von **Sigrid Spengel, Emil Hauser, Horst H. A. Linde, Anthony X. Vaz**  
und **Kuno Meyer**

(30. VIII. 67)

*Bisherige Untersuchungen.* Der nur auf den Inseln Tenerife und Palma vorkommende Kanarische Fingerhut *Isoplexis canariensis* (L.) G. DON<sup>1)</sup> ist in der letzten Zeit wiederholt untersucht worden. Zunächst haben GONZÁLEZ *et al.* [3] [4] über die Isolierung eines als Canarienglykosid A bezeichneten Diglykosides der Formel  $C_{35}H_{52}O_{12}$  berichtet, das bei der sauren Hydrolyse 3,5-Dianhydroperiplogenin (**14**) gab. TSCHESCHE *et al.* [5] zeigten später, dass dieses von den spanischen Autoren isolierte Glykosid nicht einheitlich war und nach Spaltung mit Luizym im Papierchromatogramm 3 Aglykone erkennen liess, von denen 2 auf Grund der Rf-Werte als Pachygenin [6] und Xysmalogenin (**32**) [7] [8] angesehen wurden, während das dritte sich keinem bekannten Genin zuordnen liess. GONZÁLEZ<sup>3)</sup> konnte ausserdem noch Uzariogenin (**30**) unter den Aglykonen aus *I. canariensis* nachweisen. Als Zuckerkomponenten waren durch Papierchromatographie Glucose und Fucose sowie Rhamnose wahrscheinlich gemacht worden [4]. – Unabhängig voneinander haben 1963 2 Arbeitsgruppen [2] [9] über eine eingehendere chemische Untersuchung der Glykoside von *I. canariensis* berichtet, die, auf der Monosidstufe durchgeführt, ergeben hatte, dass das bisher nicht isolierte Hauptglykosid als Aglykon das bis anhin noch unbekanntes  $\Delta^4$ -Dehydrodigitoxigenin = *Canarigenin* (**38**) und als Zuckerkomponenten *Glucose* und *Digitoxose* enthalten muss. Canarigenin konnte auch als Aglykon eines Xanthhydrolopositiven [10] Nebenglykosids nachgewiesen werden, dessen neuer 2-Desoxyzucker als *Canarose* (**16**) bezeichnet wurde [2]<sup>4)</sup>. Derselbe Zucker fand sich auch in einem weiteren Nebenglykosid an *Xysmalogenin* (=  $\Delta^5$ -Dehydrodigitoxigenin) (**32**) gebunden [2].

*Ziel der vorliegenden Untersuchungen.* Da eine Isolierung und Auftrennung der genuinen Glykoside von *I. canariensis* bisher nie durchgeführt worden ist, haben wir solche Versuche unternommen und berichten über die dabei gewonnenen Ergebnisse<sup>5)</sup>.

**1. Extraktion und Auftrennung der KEDDE-positiven [11] Substanzen.** – Die Extraktion des Blattpulvers wurde wie früher beschrieben [2] durchgeführt. Werden die einzelnen Chloroform-Äthanol-(4:1)-Auszüge [2]<sup>6)</sup> getrennt eingedampft, dann

<sup>1)</sup> Für diese *Digitalis*-Art sind früher andere botanische Bezeichnungen wie *Isoplexis canariensis* L. und *Callianassa canariensis* (W. & B.) verwendet worden. Die neue, hier benützte Nomenklatur haben wir aus der Arbeit von WERNER [1] übernommen.

<sup>2)</sup> 1. Mitteilung: P. STUDER *et al.* [2].

<sup>3)</sup> Private Mitteilung an Prof. R. TSCHESCHE, siehe [5], Fussnote 12.

<sup>4)</sup> Das die Canarose enthaltende Monosid ist von TSCHESCHE *et al.* [9] als ein Boivinosid angesehen worden.

<sup>5)</sup> Nachdem die vorliegende Arbeit abgeschlossen war, erhielten wir Kenntnis von analogen Versuchen, über die vor kurzem BENÍTEZ *et al.* [12] berichteten.

<sup>6)</sup> Auf Grund der biologischen Prüfung enthält dieser Teil rund 90% der Herzaktivität des Blattpulvers.

lassen sich die zuerst erhaltenen leicht aus Methanol-Aceton zur Kristallisation bringen<sup>7)</sup>. Aus je 1 kg Blattpulver konnten durchschnittlich 8 g Rohkristallisate gewonnen werden, die im Dünnschichtchromatogramm 2 Flecke der Glykoside «A» und «B», die Mutterlaugenrückstände ausserdem noch 1–2 Flecke polarerer Substanzen zeigten. Eine Trennung von «A» und «B» wurde zunächst mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie unter Benützung des vor allem für qualitative Zwecke viel verwendeten und bewährten Systems I nach KAISER [13] versucht. Dabei war es wohl möglich, «A» von «B»<sup>8)</sup> abzutrennen, doch ist dieses Verfahren sehr unrationell. Eine chromatographische Aufteilung der Peracetylverbindungen von «A» und «B» nach REICHSTEIN & ROSENMUND [14]<sup>9)</sup> ist ebenfalls durchführbar. Die Verseifung der Acetylverbindungen mit  $\text{KHCO}_3$  verläuft aber nur langsam. Nach 2–3 Tagen enthält die Reaktionslösung nach Dünnschichtchromatogramm neben «A» (1) bzw. «B» (17) fast nur noch eine etwas unpolare Substanz als 1 bzw. 17. Diese beiden Verseifungsprodukte aus acetyliertem «A» bzw. «B» sind wahrscheinlich Monoacetylverbindungen<sup>10)</sup>.

Als bestes Verfahren zur präparativen Auftrennung des Rohkristallisates erwies sich schliesslich die von STOLL *et al.* [15] beschriebene Verteilung an wasserhaltigem Silicagel. – Die Mutterlaugenrückstände des Rohkristallisates mussten dagegen zunächst durch Verteilungschromatographie an Hyflo-Supercel-Wasser vorgetrennt werden. Die dabei gewonnenen C- und «D»-reichen Fraktionen<sup>11)</sup> wurden hierauf wie das Glykosidgemisch «A» und «B» an wasserhaltigem Silicagel mehrmals aufgetrennt.

## 2. Charakterisierung und chemische Untersuchung der genuinen Glykoside. –

2.1. *Glykosid «A» (1)*, Smp. 305–306° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -61,5^\circ$  (Pyridin). Die Xanthhydrolyse-Reaktion [10] war positiv. Die Acetylverbindung blieb amorph. – Enzymatische Abspaltung<sup>12)</sup> von Glucose aus dem Glykosid «A» gab ein Monosid, das im Dünnschichtchromatogramm nur *einen* Fleck erkennen liess, der identisch mit dem des früher [2] beschriebenen Monosids «e» war. Dass es sich beim Monosid «e» um ein Gemisch handelte, konnte früher [2] bereits durch milde saure Hydrolyse festgestellt werden, wobei neben *Canarigenin (38)*, *Xysmalogenin (32)* und *Xysmalogenin-*

<sup>7)</sup> Früher [2] waren alle Chloroform-Äthanol-(4:1)-Auszüge vereinigt worden. Eine Kristallisation ist dann kaum mehr möglich oder nur noch sehr schwer zu erzielen.

<sup>8)</sup> Diese erwiesen sich später beide als Gemische dreier Glykoside (siehe weiter unten), die je 1 endständige Glucosemolekel enthalten, da bei milder saurer Hydrolyse Canarobiose (15) bzw. Digilanidobiose (29) entstehen und nicht Trisaccharide.

<sup>9)</sup> Diese ist vor allem dann sehr brauchbar, wenn die Geninanteile keine oder unter den üblichen Bedingungen nicht acetylierbare HO-Gruppen enthalten. Andernfalls werden bei der milden Verseifung der Peracetylverbindungen mit  $\text{KHCO}_3$  nur die leicht spaltbaren Acetylgruppen in den Zuckerresten verseift, nicht aber diejenigen im Geninanteil, wodurch eine Regenerierung der genuinen Glykoside unmöglich wird.

<sup>10)</sup> In den PR.-Spektren dieser Verbindungen erscheint bei 2,0 bzw. 2,03 ppm ein scharfes Singulett. Da 2 (bzw. 19) und 6 (bzw. 21) nur wenige Prozente von «A» bzw. «B» ausmachen, dürfte die Integration dieser Signale (3 H) das Vorliegen von Monoacetylverbindungen beweisen.

<sup>11)</sup> Neben diesen als C und «D» bezeichneten Substanzen, die die Hauptflecke im Dünnschichtchromatogramm ausmachten, waren noch mehrere Begleitstoffe deutlich nachweisbar, deren Isolierung sich aber als so schwierig und zeitraubend erwies, dass auf eine Aufteilung verzichtet wurde.

<sup>12)</sup> Wir möchten der Firma RÖHM & HAAS, GMBH., Darmstadt, bestens für die Überlassung des Enzympräparates E.L. 33-63 (vgl. hierzu [8]) danken.

*canarosid* (**12**)<sup>13</sup>) sowie als einziger Zucker *Canarose* (**16**) erhalten wurden. Im AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramm [16] gab Monosid «e» nun 3 Flecke. Der nach saurer Hydrolyse erhaltene Geninanteil aus Monosid «e» bestand nach AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramm aus *Dianhydroperiplogenin* (**14**) (aus Canarigenin entstanden), *Uzarigenin* (**30**) und *Xysmalogenin*. Da das Monosid «e» als Zuckerbestandteil nur Canarose enthält, muss «e» aus den 3 Glykosiden (Reihenfolge gemäss steigender Polarität): *Uzarigenin-canarosid* (**8**), *Canarigenin-canarosid* (**10**) und *Xysmalogenin-canarosid* (**12**) bestehen. Während **8** sich im AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramm relativ gut von den beiden andern Monosiden abtrennen lässt, unterscheiden sich die beiden ungesättigten Substanzen **10** und **12** nur wenig in ihren Rf-Werten. **8**, **10** und **12** konnten – wie weiter unten noch ausgeführt wird – als einheitliche Produkte gefasst und charakterisiert werden. – Zur Gewinnung des dem Glykosid «A» zugrundeliegenden Disaccharids wurde **1** in 0,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Methanol-(1:1) hydrolysiert. Der dabei gebildete Zuckeranteil war nach Dünnschichtchromatogramm ein Gemisch von Methylencanarose, Canarose, Methylcanarobiose und *Canarobiose* (**15**), in dem **15** stark überwog. Dieses Disaccharid konnte durch Chromatographie an SiO<sub>2</sub> völlig rein erhalten werden und war identisch mit der früher [8] beschriebenen Canarobiose.

Die *Glykoside* A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> liessen sich aus dem Acetylierungsprodukt des Glykosids «A», das im Dünnschichtchromatogramm in verschiedenen Systemen jeweils nur einen Fleck, im AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramm dagegen 2 deutlich voneinander abgesetzte Flecke<sup>14</sup>) gab, wie folgt gewinnen: das amorphe Acetylierungsprodukt aus «A» wurde über eine mit AgNO<sub>3</sub> imprägnierte SiO<sub>2</sub>-Säule [17] aufgetrennt. Dabei konnten nur die beiden Acetylverbindungen **3** und **5** kristallisiert werden<sup>15</sup>). Hydrolyse mit NH<sub>3</sub> in wässrig-methanolischer Lösung [18] gab aus **3** das freie *Glykosid* A<sub>1</sub> (**2**) (Smp. 308–309° (Zers.)) und aus **5** das *Glykosid* A<sub>2</sub> (**4**) (Smp. 287–289° (Zers.)). – Das aus **2** durch enzymatischen Abbau gewonnene Desglucoprodukt (= *Monosid* e<sub>1</sub>) war identisch mit dem kürzlich [8] beschriebenen *Uzarigenin-canarosid* (**8**). Durch saure Hydrolyse von **2** wurden erwartungsgemäss Canarobiose (**15**) und *Uzarigenin* (**30**) gebildet. – Das aus dem Glykosid A<sub>2</sub> auf enzymatischem Wege gewonnene krist. Desglucoprodukt (= *Monosid* e<sub>2</sub>) stellt das bisher noch unbekannte *Canarigenin-canarosid* (**10**) dar, das als Acetylverbindung **11** charakterisiert wurde. Die saure Hydrolyse von A<sub>2</sub> gab zur Hauptsache Canarobiose (**15**) und *Dianhydroperiplogenin* (**14**) (aus Canarigenin entstanden).

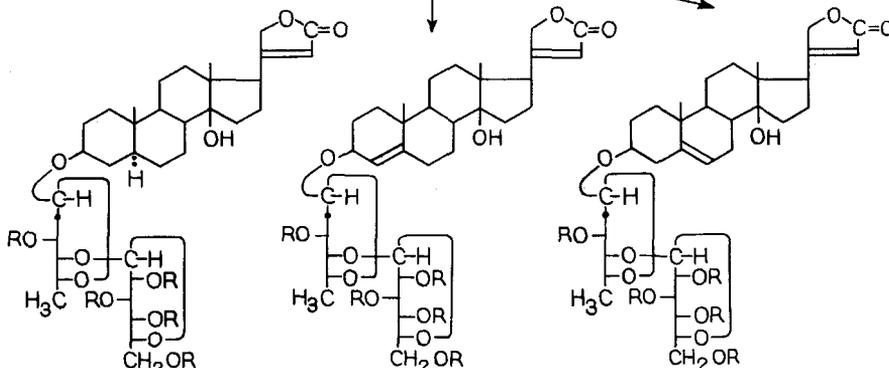
Wie oben ausgeführt, muss das aus dem Glykosid «A» durch partiellen fermentativen Abbau gewonnene Monosid «e» aus den Canarosiden des *Uzarigenins*, *Canarigenins* und *Xysmalogenins* bestehen. Während die Canaroside der beiden Butenolide **8** und **10** aus ihren nur schwer zugänglichen Glucosidverbindungen **2** und **4** erhalten werden konnten, stand uns für den präparativen Nachweis eines *Xysmalogenin-glykosids* in «A» das aus diesem gewonnene Monosidgemisch «e» zur Verfügung.

<sup>13</sup>) Die früher [2] als *Monosid e'* bezeichnete Substanz war als einheitliches *Xysmalogenin-canarosid* angesehen worden. Mit Hilfe des AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramms liess sich jetzt aber zeigen, dass dieses *Monosid e'* zu etwa gleichen Teilen aus **8** und **12** besteht.

<sup>14</sup>) Ein Lösungsmittelsystem, das eine Auftrennung in die 3 Acetylverbindungen von **2**, **4** und **6** gestattet hätte, konnte nicht aufgefunden werden.

<sup>15</sup>) Die Acetylverbindung des *Glykosids* A<sub>3</sub> (**6**) war offenbar in der verwendeten Substanzprobe nur in so geringer Menge enthalten, dass sie nicht isoliert werden konnte.

**1** Glykosid "A"  
F. 305–306° (Zers.) [–61 Py]



**2** (R=H) Glykosid A<sub>1</sub><sup>16)</sup>  
F. 308–309° (Zers.)  
(–53 Py)<sup>17)</sup>

**4** (R=H) Glykosid A<sub>2</sub><sup>16)</sup>  
F. 287–289° (Zers.)  
(–67 Py)<sup>17)</sup>

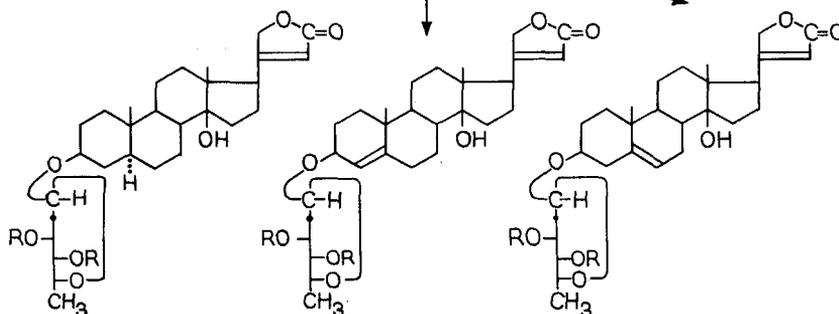
**6** (R=H) Glykosid A<sub>3</sub><sup>16)</sup>  
nicht isoliert

**3** (R=Ac) F. 212–219°  
(–18 Chf)<sup>17)</sup>

**5** (R=Ac) F. 200–210°  
(–23 Chf)<sup>17)</sup>

**1** Glykosid „A“  $\xrightarrow{\text{Enzym}}$

**7** Monosid "e" F. 150–155°/218–235° [2] + Glucose



**8** (R=H) Monosid e<sub>1</sub>  
F. 232–235° (–24 Me) [8]  
F. 145–150°/240–248°<sup>17)</sup>

**10** (R=H) Monosid e<sub>2</sub>  
F. 141–145° (–35 Me)<sup>17)</sup>

**12** (R=H) Monosid e<sub>3</sub>  
F. 228–232° (–26 Me) [8]  
F. 241–244°<sup>17)</sup>

**9** (R=Ac) F. 265–270°  
(–12 Chf) [8]

**11** (R=Ac) F. 244–248°  
(–24 Chf)<sup>17)</sup>

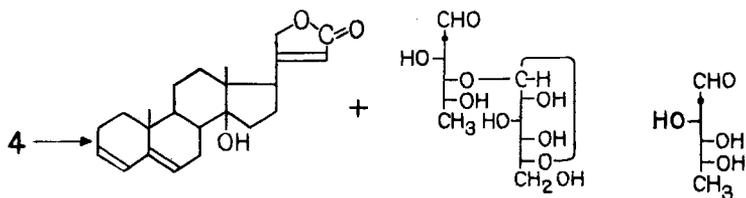
**13** (R=Ac) F. 264–270°  
(–18 Chf) [8]

Ac = CH<sub>3</sub>CO–. Die Zahlen in runden Klammern geben die spez. Drehung in den vermerkten Lösungsmitteln<sup>18)</sup> an.

<sup>16)</sup> Die Verknüpfung der Zucker ist nicht bewiesen, sondern in Analogie zu **29** formuliert.

<sup>17)</sup> Siehe exper. Teil.

<sup>18)</sup> Abkürzungen für Lösungsmittel siehe Einleitung zum exper. Teil.



**14** 3,5-Dianhydroperiplogenin  
F. 192°(-47 Chf) [19]  
F. 212–214°(-42 Chf) [4]  
F. 205–222°(Zers.)(-45 Chf) [2]

**15** Canarobiose<sup>16)</sup>  
F. 217–223°(+12W) [8]  
F. 212–216°<sup>17)</sup>

**16** D-Canarose  
F. 100–103°  
(+110 An)(+20W) [2]

Dieses wird durch milde saure Hydrolyse nur teilweise gespalten [2]: aus dem Reaktionsgemisch konnte neben einem Aglykongemisch (Hauptprodukt) noch ein Monosidgemisch erhalten werden. Von den 3 in «e» enthaltenen Monosiden **8**, **10** und **12** wird Canarigenin-canarosid (**10**) am leichtesten durch Säuren gespalten. Im AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramm des Monosidgemisches «e» unterscheiden sich **8** und Xysmalogenin-canarosid (**12**) am stärksten voneinander. Somit sollte sich **8** von **12** – wenn das im AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramm zwischen **8** und **12** liegende Canarigenin-canarosid (**10**) durch Hydrolyse völlig gespalten ist – relativ leicht auf einer AgNO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>-Säule trennen lassen. Wir haben deshalb «e» so lange der milden sauren Hydrolyse unterworfen, bis im AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramm gerade kein **10** mehr nachweisbar war. Bei der chromatographischen Auftrennung des nach der Hydrolyse gewonnenen Genin-Monosid-Gemisches an AgNO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> konnte neben den weniger polaren Substanzen Dianhydroperiplogenin (**14**), Canarigenin (**38**), Xysmalogenin (**32**) und Uzarigenin-canarosid (**8**)) einheitliches *Xysmalogenin-canarosid* (**12**) vom Smp. 241–244° erhalten werden. Damit ist auch das dritte der dem Glykosid «A» zugrundeliegenden Monoside (= *Monosid e*<sub>3</sub>) [8] isoliert.

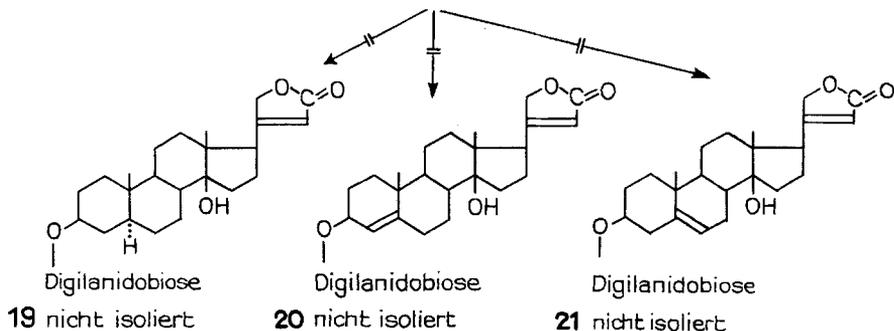
2.2. *Glykosid «B»* (**17**), Smp. 260–265°;  $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$  (Pyridin). Die Xanthhydrolyse-Reaktion war positiv. Die Acetylverbindung **18** schmolz bei 191–196° und zeigte  $[\alpha]_D^{20} = +15^\circ$  (Chloroform). Sie war nach AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramm nicht einheitlich. Alle Versuche, die Acetylverbindung von «B» durch Verteilung an AgNO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>-Säulen aufzutrennen, scheiterten bisher. Die einzelnen Bestandteile von «B» müssen dasselbe Disaccharid, nämlich *Digilanidobiose*<sup>19)</sup> enthalten, weil nach milder saurer Hydrolyse nur **29** isoliert bzw. im Dünnschichtchromatogramm nachgewiesen werden konnte.

Da eine Auftrennung des Glykosids «B» erfolglos war, versuchten wir, nach enzymatischer Abspaltung der endständigen Glucose<sup>12)</sup> das dem Glykosid «B» zugrundeliegende Gemisch der Diglucoside aufzutrennen. Dieses war nach Dünnschichtchromatogramm einheitlich und identisch mit dem früher beschriebenen *Monosid d* [2], von dem wir angenommen hatten, dass es reines *Canarigenin-diglucosid* (**25**) sei. Eine Überprüfung im AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatogramm zeigte nun, dass dieses Monosid neben einem starken Hauptfleck einen sehr kleinen, deutlich abge-

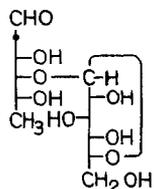
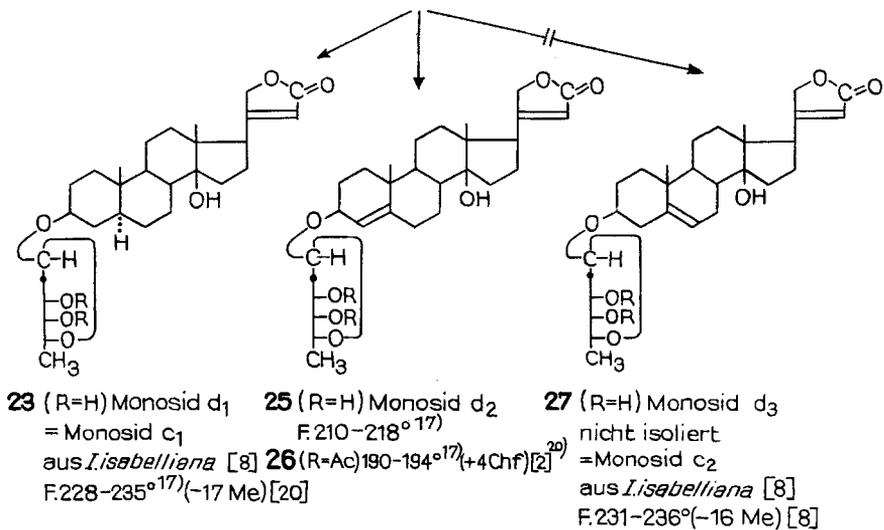
<sup>19)</sup> Digilanidobiose ist von der spanischen Arbeitsgruppe [4] bereits vor einiger Zeit bei der sauren Hydrolyse einer rohen Glykosidfraktion erhalten worden.

**17** Glykosid "B"  
F. 260–265° (–17 Py)<sup>17)</sup>

**18** Acetylverbindung  
F. 191–196° (+15 Chf)<sup>17)</sup>



Glykosid "B"  $\xrightarrow{\text{Enzym}}$  **22** Monosid "d" F. 190–201° (–11 Chf) [2] + Glucose



**29** Diglucanidobiose F. 229–230° (+30 W) [21]

**30** (R=H) Uzarigenin F. 230–246° (+14 Alk) [22]

**32** (R=H) Xysmalogenin F. 253–259° (+17 Me) [7]

**31** (R=Ac) F. 267° (+8 Chf) [22]

**33** (R=Ac) F. 250–255° (–16 Chf) [7]  
F. 259–266° (–10 Chf) [8]

setzten Fleck einer etwas unpolaren Substanz gibt, weshalb wir es jetzt als *Monosid* «d» (22) bezeichnen. Auch die Acetylverbindung von «d» ruft im  $\text{AgNO}_3$ -Dünnschichtchromatogramm 2 Flecke hervor. Beim «Hydrolysentest» [2] gibt der aus «d» gewonnene Geninanteil im  $\text{AgNO}_3$ -Dünnschichtchromatogramm 3 (!) Flecke: einen sehr starken unpolaren von *Dianhydroperiplogenin* (14) (aus Canarigenin entstanden!) sowie 2 kleine, etwa gleich grosse Flecke, die in ihren Rf-Werten *Uzarigenin* und *Xysmalogenin* entsprechen. Demnach muss das Glykosid «B» aus den Digilanidobiosiden des Uzarigenins, Canarigenins und Xysmalogenins bestehen, bzw. das Monosid «d» neben dem Hauptglykosid Canarigenin-digitoxosid auch die Digitoxoside des Uzarigenins und Xysmalogenins enthalten.

Da eine vollständige Auftrennung des Monosids «d» in die einzelnen Glykoside auf chromatographischem Wege nicht möglich war, haben wir den Beweis für die oben postulierte Zusammensetzung des Monosids «d» durch die Isolierung der *Monoside*  $d_1$  (23) und  $d_2$  (25) erbracht und uns beim *Monosid*  $d_3$  (27), das bereits bekannt ist [8], auf den präparativen Nachweis seines Genins (Xysmalogenin) beschränkt<sup>21)</sup>. – Die Isolierung von *Uzarigenin-digitoxosid* (23) aus dem Monosid «d» (22) liess sich nach Epoxidierung von 22 leicht durchführen: aus dem Epoxidgemisch der beiden Digitoxoside 25 und 27 konnte das unveränderte Uzarigenin-digitoxosid als einheitliches Produkt leicht und quantitativ durch Chromatographie an  $\text{SiO}_2$  abgetrennt werden. Es zeigte sich dabei, dass das Monosid «d» etwa 5% Uzarigenin-digitoxosid enthalten hatte. – Das *Monosid*  $d_2$  konnte erst nach wiederholter chromatographischer Auftrennung an  $\text{AgNO}_3$ - $\text{SiO}_2$ -Säulen so weit von seinen Begleitstoffen befreit werden, dass es im  $\text{AgNO}_3$ -Dünnschichtchromatogramm nur *einen* Fleck gab. Es enthielt aber nach «Hydrolysentest» [2] immer noch eine Spur von 27. – Zur Gewinnung des *Xysmalogenins* (32) wurde das Monosid «d» hydrolysiert und aus dem dabei erhaltenen Geninteil das Cardenolid 32 durch Chromatographie an  $\text{SiO}_2$  (vom Uzarigenin und dem Hauptprodukt Dianhydroperiplogenin) abgetrennt.

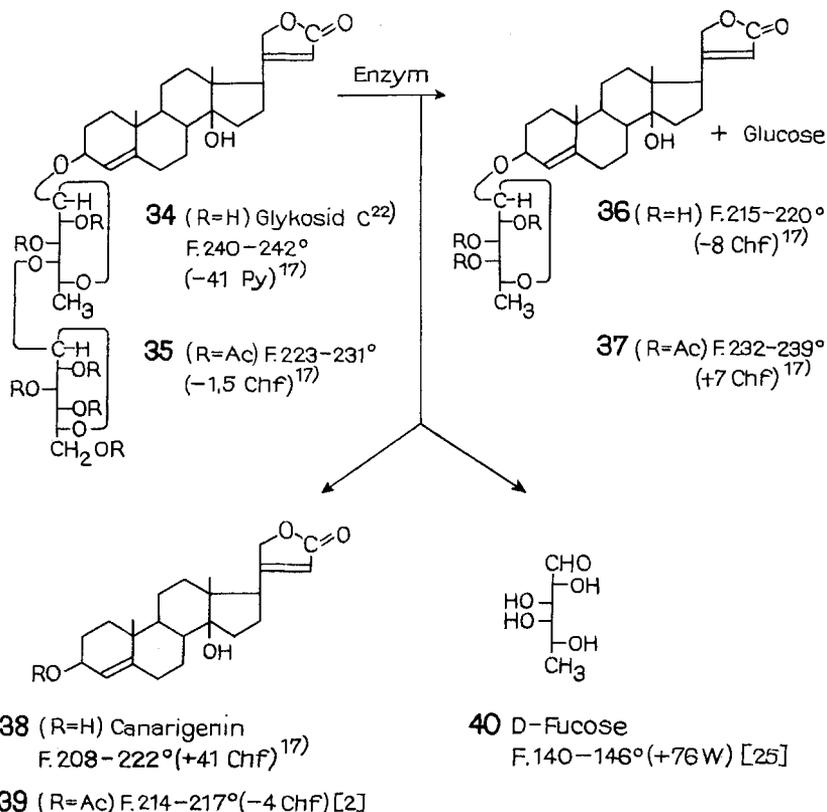
2.3. *Glykosid C = Canarigenin-glucosido-fucosid* (34), Smp. 240–242°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -41^\circ$  (Pyridin). Bei der enzymatischen Spaltung mit dem Fermentpräparat E.L. 33–63<sup>12)</sup> wurde nicht nur die endständige Glucose, sondern auch der am Genin haftende Zucker abgespalten. Das Genin konnte in Kristallen gewonnen werden und erwies sich als *Canarigenin* (38). Chromatographie des Zuckergemischs gab krist. *D-Fucose* (40). Die *Glucose* wurde im Dünnschichtchromatogramm nachgewiesen. – Durch Strophanthobiase [23] wird im Glykosid C grösstenteils nur die endständige Glucosemolekel abgespalten, wobei das Monosid *Canarigenin-D-fucosid* (36) vom Smp. 215–220° und  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -8^\circ$  (Chloroform) entsteht.

2.4. *Glykosid «D»*, Smp. 259–263°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -63^\circ$  (Methanol) gab eine positive KEDDE [11]- und Xanthidrol [10]-Reaktion. Das Glykosid schien nach Dünnschichtchromatogramm einheitlich zu sein. Bei der sauren Hydrolyse entstanden aber

<sup>20)</sup> Diese Werte für die spez. Drehung wurden beim Monosid «d» bzw. seiner Acetylverbindung ermittelt. Sie dürften innerhalb der Fehlergrenze auch für das Monosid  $d_2$  gelten, da die beiden Nebenprodukte 23 (bzw. 24) und 27 (bzw. 28) nur etwa 10–15% ausmachen und fast identische  $[\alpha]_{\text{D}}$ -Werte geben.

<sup>21)</sup> Versuche, wie im Fall des Monosids «e» das Canarigenin-monosid durch Spaltung zu eliminieren, schlugen fehl, da die Digitoxoside 25 und 27 sich unter den angewandten Bedingungen nicht partiell hydrolysieren lassen.

mindestens 5 Substanzen, die in ihrer Polarität (im Dünnschichtchromatogramm) den folgenden Substanzen entsprechen: Dianhydroperiplogenin (**14**), Anhydrouzarigenin, unidentifizierte Substanz, Uzarigenin (**30**) und Xysmalgenin (**32**).



**3. Diskussion der Resultate.** – Schon die ersten Arbeiten [3] [4] über die Glykoside von *I. canariensis* hatten ergeben, dass diese zwei Zucker enthalten (Isolierung von Digilanidobiose). Es war aber bisher nicht möglich, aus dem Glykosidgemisch einheitliche Disaccharidderivate zu gewinnen. Auch das vor kurzem von spanischen Autoren [12] beschriebene neue Diglykosid aus *I. canariensis* erwies sich als nicht einheitlich und bestand zur Hauptsache aus Canarigenin-glucosido-canarosid, das noch wenig eines Xysmalogeninglykosids enthielt. Bei unseren ersten Untersuchungen [2] über die Glykoside von *I. canariensis*, die auf der Monosidstufe durchgeführt wurden, konnten u. a. 2 neue als Monosid «e» und Monosid d bezeichnete Glykoside erhalten werden. Während das Monosid d, das die Hauptmenge der durch enzymatischen Abbau des rohen genuinen Glykosidgemisches gewonnenen Desglucoprodukte darstellte, als reines Canarigenin-digitoxosid angesehen worden war, ergab die milde saure Hydrolyse des Monosids «e», dass dieses neben Canarigenin-canarosid auch noch

<sup>22)</sup> Die Verknüpfungsstelle der Glucose an C-4 des Fucoseanteils ist nicht bewiesen. Vgl. hierzu Cheirosid A [24].

Xysmalogenin-canarosid enthielt. Etwa zur selben Zeit haben TSCHESCHE *et al.* [9] über 2 neue Monoside aus *I. canariensis* berichtet. Die unseren Monosiden «e» und d entsprechenden Glykoside wurden von den deutschen Autoren als Canari-boivinosid bzw. Canari-digitoxosid bezeichnet und für diese Glykoside die ungewöhnliche furanoide Struktur in Vorschlag gebracht, da nach der Methode von VISCONTINI *et al.* [26] (Oxydation mit Perjodat und nachfolgende Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> und Hydrolyse) kein Propylenglykol nachgewiesen werden konnte. Wir haben diese Versuche wiederholt und fanden demgegenüber, dass in beiden Fällen Propylenglykol gebildet wird. Damit ist die pyranoide Struktur für diese Glykoside bewiesen. Eine solche ergibt sich auch aus der Tatsache, dass BRETÓN *et al.* [4] nach Hydrolyse ihres rohen Canarienglykosids A – dem als Monosidbestandteil ja zur Hauptsache das Canari-digitoxosid von TSCHESCHE *et al.* zugrundeliegen muss – krist. Digilanidobiose (29) erhalten hatten, die als 4-O-(β-D-Glucopyranosido)-D-digitoxopyranose erkannt worden ist [21], womit eine furanoide Struktur des Digitoxoseanteils im Canari-digitoxosid *a priori* ausgeschlossen wird<sup>23)</sup>.

Aus den molekularen Drehungen der Monoside war früher bereits abgeleitet worden, dass die Zucker jeweils mit dem Aglykon β-glykosidisch verknüpft sind. Dies gilt auch für das in dieser Arbeit neue Canarigenin-fucosid (36), in Übereinstimmung mit der von KLYNE [27] gefundenen Regel, wonach fast alle natürlichen digitaloiden Glykoside von D-Zuckern die β-Form darstellen. Dasselbe trifft auch für die Bindung der endständigen Glucose in den hier beschriebenen Diglykosiden zu. Lediglich die Verknüpfungsstelle dieser Bindung in den Glykosiden A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> (und A<sub>3</sub>) sowie im Glykosid C ist willkürlich formuliert<sup>23)</sup>.

Das Hauptglykosid der Blätter von *I. canariensis* ist *Canarigenin-digilanidobiosid* (20), das allerdings bisher nur im Gemisch mit den Digilanidobiosiden 19 und 21 – die darin gesamthaft zu etwa 10–15% enthalten sind – gewonnen werden konnte. Die totale Menge an Canarigenin-2-desoxyglykosiden lässt sich in der Weise bestimmen, dass man nach milder saurer Hydrolyse des Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extraktes<sup>6)</sup> das gebildete Dianhydroperiplogenin (14) auf spektrophotometrischem Wege quantitativ bestimmt. Wir ermittelten so pro 5 g Blattpulver bis 43 mg 14, was etwa 1,6% Canarigenin-2-desoxyglykosid (C<sub>35</sub>H<sub>52</sub>O<sub>12</sub>) entspricht.

Der Direktion der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel, danken wir bestens für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

### Experimenteller Teil

Allgemeines. – Alle Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze bis 200° ca. ± 2°, darüber ca. ± 3°.

Abkürzungen: Ac<sub>2</sub>O = Acetanhydrid, AcOH = Eisessig, Ä = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Bz = Benzol, Bn = *n*-Butanol, Chf = Chloroform, Cy = Cyclohexan, DC = Dünnschichtchromatographie, Di = Dioxan, E = Essigsäure-äthylester, EW = E mit W gesättigt, Fmd = Formamid, Fr = Fraktion(en), «Mischung» = Chf-E-Me-(1:1:1), Isop = Isopropylalkohol, Me = Methanol, Mek = Methyl-äthyl-keton, MekW = mit W gesättigtes Mek, ML = eingedampfte Mutterlauge(n), Pe = Petroläther, Pn = *n*-Pentan, Py = Pyridin, RV = Rotationsverdampfer, SiO<sub>2</sub> = Kieselgel (zur DC: SiO<sub>2</sub> «CAMAG» mit 5% CaSO<sub>4</sub>, zur Säulenchromatographie: SiO<sub>2</sub> «MERCK», 0,05–0,2 mm), Thf = Tetrahydrofuran, To = Toluol, Tr = Tropfen, W = Wasser.

<sup>23)</sup> BENÍTEZ *et al.* [12] haben die von TSCHESCHE *et al.* nur als wahrscheinlich angenommene furanoide Struktur dieser Glykoside übernommen und den in ihrer letzten Arbeit publizierten Formelbildern zugrundegelegt.

*Chromatographie:* Zur Herstellung der DC- und  $\text{AgNO}_3$ -DC-Plättchen und Bereitung von  $\text{AgNO}_3 \cdot \text{SiO}_2$  für die Säulenchromatographie siehe [8]. Die Sichtbarmachung der gewanderten Substanzen geschah durch Besprühen mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Alk-(1:1) und Erhitzen über einem Infrarotstab.

Für *enzymatische Spaltungen* wurde neben E.L. 33-63<sup>12)</sup> auch Strophanthobiase [23] verwendet.

## 1. Extraktion der Blätter und Gewinnung des Rohkristallisates

*Beispiel:* 1,2 kg lufttrockene, staubfein gemahlene Blätter wurden mit 2,5 l Alk aufgeschlämmt und 1 Std. unter gelegentlichem Rühren im Wasserbad bei 50° stehengelassen. Hierauf wurde noch warm durch eine mit Hyflo Supercel gedichtete Nutsche filtriert, die Blattpulverschicht sorgfältig abgehoben und diese mit 1,5 l frischem Alk wie bei der ersten Extraktion ausgezogen und durch dasselbe Filter filtriert. Dieses Verfahren wurde insgesamt 8–10mal durchgeführt. Danach schmeckte das Blattpulver nur noch sehr wenig bitter. Die vereinigten Alk-Auszüge wurden im RV unter vermindertem Druck bei etwa 50° Badtemperatur auf 1,2 l eingengt. Der dunkelgrün gefärbte Extrakt wurde mit 1,2 l einer Aufschlammung von frisch (aus 1,3 kg Bleiacetat-trihydrat) gefälltem und mit kaltem W neutral gewaschenem  $\text{Pb}(\text{OH})_2$  versetzt und 30 Min. geschüttelt. Hierauf wurde durch eine mit Hyflo Supercel gedichtete Nutsche filtriert, der  $\text{Pb}(\text{OH})_2$ -Niederschlag mit 300 ml 50-proz. Alk aufgeschlämmt, 15 Min. geschüttelt, abgenutscht und noch 2mal mit 80-proz. Alk in gleicher Weise ausgezogen. Die vereinigten Filtrate wurden mit verd.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf ein pH von 5,8 eingestellt und unter vermindertem Druck im RV bei 40° vom Alk und einem Teil des W befreit, bis das Endvolumen etwa 800 ml betrug. Die wässrige Glykosidlösung wurde nun im Scheidetrichter 8mal mit je 1 l Ä, 6mal mit je 1 l Chf (beides verworfen) und 8–10mal mit je 1 l Chf-Alk-(4:1) ausgeschüttelt. Die Chf-Alk-Auszüge passierten der Reihe nach 3 Scheidetrichter, die je 150 ml W enthielten, und wurden dann über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und einzeln im Vakuum eingedampft. Die erhaltenen Rückstände wurden in der eben nötigen Menge Me gelöst und mit An versetzt. Dabei bildeten sich in der Regel in den ersten 3–6 Auszügen Kristalle, die abgenutscht und aus Chf-Me (unter Zusatz von wenig W) oder aus viel An-W umkristallisiert wurden. Smp. zwischen 240 und 260°. Im DC (MekW) gab dieses Rohkristallisat 2 blauviolette Flecke der Glykoside «A» und «B» und beim Auftragen grösserer Mengen noch einen sehr schwachen dritten polaren Fleck, die ML ausserdem noch 1–2 weitere Flecke von noch polaren Substanzen.

### 1.1. Auftrennung des Rohkristallisates in die Glykoside «A» (1) und «B» (17). –

1.1.1. *Durch präparative PC.* 225 mg Rohkristallisat wurden in 2,3 ml Chf-Me-(1:1) gelöst und auf 18 mit Fmd imprägnierten Bogen MN Chromatographiepapier, 19 × 47 cm Nr. 214 (MACHEREY, NAGEL & Co., Düren, Deutschland), aufgetragen. Die Bogen wurden im Schlitztroch [28] mit einem Gemisch von Chf-Thf-Fm-(50:50:6,5) [13] während 17 Std. entwickelt. Nach dem Trocknen wurden aus den Papierbogen der Länge nach schmale Streifen am Rande und in der Mitte herausgeschnitten und mit  $\text{SbCl}_3$ -Chf (20-proz.) besprüht. An Hand dieser Orientierungsstreifen wurden die Zonen mit den beiden Glykosiden «A» und «B» auf den Papierbogen lokalisiert, herausgeschnitten, zerkleinert und in je 200 ml W 1 Std. stehengelassen. Hierauf fügte man 200 ml Alk zu und erwärmte 5–10 Min. auf 40°. Der entstandene Papierbrei wurde abgesaugt, der Rückstand mit Chf-Alk-(1:1) 4mal warm extrahiert, die vereinigten Auszüge im Vakuum auf ein kleines Volumen konzentriert und 4mal mit Chf und 10mal mit Chf-Alk-(4:1) ausgeschüttelt. Die vereinigten Chf-Alk-(4:1)-Auszüge wurden im Vakuum eingedampft, die Rückstände in Chf-Alk-(4:1) gelöst, durch eine ganz kleine Menge  $\text{Al}_2\text{O}_3$  filtriert und im Vakuum zur Trockene gebracht. Der das unpolare Glykosid enthaltende Rückstand gab aus Me-Chf (+ wenig W) und nach nochmaligem Umlösen 22 mg Kristalle (feine Nadelchen des Glykosids «A» (1), Smp. 305–306° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -61,5 \pm 2^\circ$  (Py). In gleicher Weise wurden 40 mg «B» (17) gewonnen: feine Kristallnadeln vom Smp. 259–261°;  $[\alpha]_D^{20} = -17 \pm 2^\circ$  (Py). Das Acetylierungsprodukt von «A» war amorph, dasjenige von «B» konnte in feinen Nadeln (aus An-Ä) vom Smp. 160–175° (siehe weiter unten) erhalten werden.

1.1.2.1. *Chromatographie des acetylierten Rohkristallisates: Acetylverbindungen «A» und «B».* 6 g Rohkristallisat wurden in 30 ml Py und 20 ml  $\text{Ac}_2\text{O}$  bei 37° acetyliert (20 Std.). Das rohe Acetylierungsprodukt (ca. 8 g) wurde an 300 g  $\text{SiO}_2$  chromatographiert. Die Eluate mit Bz-Chf-

(1:9) und die ersten mit Chf gaben ölige Eindampfrückstände (total etwa 2 g), die nach DC die *Acetylverbindung von «A»* enthielten. Sie liessen sich nicht zur Kristallisation bringen. Die späteren Fr mit Chf hinterliessen nach dem Eindampfen etwa 6 g Rückstand. Aus An-Ä 3,6 g nach DC [E-Pe-Chf-(7:15:15)] einheitliche Kristalle der *Acetylverbindung von «B» (18)*, Smp. 172–185°, Smp. nach Umlösen aus An: 191–196°;  $[\alpha]_D^{20} = +15^\circ \pm 2^\circ$  (Chf). Im  $\text{AgNO}_3$ -DC [Chf-Me-(85:15)] neben dem Hauptfleck ein sehr schwacher Fleck einer unpolaren Substanz, die nicht als klar abgesetzter Fleck erschien, sondern als kleine «Kappe» auf dem Hauptfleck aufsass.

1.1.2.2. *Verseifung des Acetylierungsproduktes von «A»: Glykosid «A» und Monoacetylverbindungen des Glykosids «A»*. 2 g der amorphen Acetylverbindung von «A» wurden in 120 ml Me gelöst, mit der Lösung von 3,0 g  $\text{KHCO}_3$  in 63 ml W versetzt und 5 Wochen bei 20° stehengelassen. Nach Neutralisieren mit verd. HCl wurde von den ausgeschiedenen Kristallen abgesaugt (Aufarbeitung der Lösung siehe weiter unten). Die ausgefallenen Kristalle bestanden nach DC (MekW) aus Glykosid «A» (1) und der Monoacetylverbindung von 1 (siehe weiter unten). Aus Me-Chf (und wenig W) 120 mg *Glykosid «A»* vom Smp. 304–306° (Zers.) und 60 mg vom Smp. 299–301° (Zers.). Beide Kristallfraktionen gaben im DC nur einen Fleck. Die ML enthielten neben 1 vor allem dessen Monoacetylverbindungen. – Die von den Kristallen abgetrennte Lösung aus der Verseifung (siehe oben) wurde im Vakuum vom Me befreit und zunächst 3mal mit je 100 ml Ä ausgeschüttelt (verworfen) und hierauf 8mal mit je 100 ml Chf extrahiert, wobei sich 400 mg Substanz gewinnen liessen: nach DC neben 1 zur Hauptsache Monoacetylverbindungen von 1. Weitere 4 Extraktionen mit je 100 ml Chf gaben 120 mg 1. Schliesslich wurde noch 6mal mit Chf-Alk-(4:1) extrahiert: 545 mg 1, die Spuren des Glykosids «B» enthielten. Aus Me-Chf 400 mg 1 vom Smp. 304–306° (Zers.). Zur Gewinnung eines im DC einheitlichen Präparates der Monoacetylverbindungen von «A» wurden 98 mg Substanz (siehe oben), die noch etwas Glykosid «A» enthielt, in 1 ml Me mit einigen Tropfen Chf und W gelöst, mit 99 ml EW versetzt, auf eine Säule von 60 g  $\text{SiO}_2$ -W-(5:1) (Höhe 21 cm, Durchmesser 2,1 cm) gebracht und zunächst mit 300 ml EW mit 1% Me durchgewaschen. Die ersten Fr-Rückstände wogen zusammen nur 3 mg. Weitere 300 ml EW mit 1½% Me eluierten 73 mg *Monoacetylverbindungen von «A»*. Aus Me-Chf 58 mg Nadeln vom Smp. 263–274°;  $[\alpha]_D^{19} = -46,3^\circ \pm 3^\circ$  (Py). Die späteren Eluate mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch enthielten zunächst Monoacetylverbindungen von «A» und freies «A», die letzten nur «A» (18 mg).

1.1.2.3. *Verseifung des Acetylierungsproduktes von «B»: Glykosid «B» und Monoacetylverbindungen des Glykosids «B»*. 0,7 g Acetylprodukt von «B» (Smp. 186–192°) wurde in 76 ml Me gelöst, mit der Lösung von 1 g  $\text{KHCO}_3$  in 39 ml W versetzt und 10 Tage bei 20° stehengelassen. Dann wurden 580 mg  $\text{KHCO}_3$  gelöst in 23 ml W und 44 ml Me, zugegeben, weitere 16 Tage stehengelassen, hierauf nochmals mit 580 mg  $\text{KHCO}_3$  in 23 ml W versetzt und weitere 16 Tage stehengelassen. Nach total 42 Tagen wurde mit verd. HCl neutralisiert und die ausgeschiedenen Kristalle (375 mg) abfiltriert. Die wässrige-methanolische Lösung wurde im Vakuum vom Me befreit, 5mal mit je 50 ml Chf extrahiert (= 15 mg Rückstand, verworfen), hierauf 15mal mit je 50 ml Chf-Alk-(4:1) ausgezogen (= 100 mg Rückstand) und schliesslich noch 5mal mit Chf-Alk-(3:2) ausgeschüttelt (= 82 mg Rückstand). Die Kristalle und Extraktionsrückstände (total 557 mg) gaben nach dem Umlösen aus Chf-An feine Nadelchen des *Glykosids «B» (17)*, Smp. 258–261°;  $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ \pm 2^\circ$  (Py). – Zur Gewinnung der Monoacetylverbindung von «B» wurden 2,1 g Acetylverbindung «B» in 400 ml Me gelöst, mit der Lösung von 6,5 g  $\text{KHCO}_3$  in 275 ml W versetzt und 45 Std. bei 20° stehengelassen. Danach zeigte das DC neben 17 nur noch einen Fleck einer etwas unpolaren Substanz. Nach Neutralisation mit verd. HCl wurde mehrmals mit je 200 ml Chf extrahiert: 145 mg Monoacetylverbindung «B», die etwas «B» enthielt. Nach Verjagen des Me im Vakuum wurden mit Chf-Alk-(3:2) 1,3 g Gemisch (Monoacetylverbindungen von 17 sowie 17) extrahiert. Dieses wurde nochmals in 100 ml Me mit 2 g  $\text{KHCO}_3$  gelöst in 25 ml W, während 3 Wochen bei 20° stehengelassen, dann neutralisiert, im Vakuum vom Me befreit und mit Chf-Alk-(3:2) extrahiert: 925 mg rohes «B». Nach dem Umlösen aus Chf-Me 700 mg Glykosid «B» vom Smp. 260 bis 265°. – Die Monoacetylverbindungen von «B» wurden analog wie die Monoacetylverbindungen von «A» (siehe oben) auf einer  $\text{SiO}_2$ -W-Säule verteilt. Dabei wurden 110 mg nach DC einheitliche *Monoacetylverbindungen von «B»* erhalten. Aus Chf-Me 80 mg feine Nadeln vom Smp. 240–258°;  $[\alpha]_D^{22} = -37^\circ \pm 2^\circ$  (Py).

1.1.3. *Durch Verteilung an  $\text{SiO}_2$ -W [15]*. 800 g  $\text{SiO}_2$  wurden in einer Pulverflasche allmählich unter Schütteln mit 160 ml dest. W versetzt und 16 Std. bei 20° stehengelassen. Das mit W belade-

ne  $\text{SiO}_2$  wurde in mit W gesättigtem E suspendiert und unter Umschwenken in ein Chromatographierohr von 180 cm Länge und 3,5 cm innerem Durchmesser eingetragen. Die Säulenhöhe des  $\text{SiO}_2$  betrug nach dem Absetzenlassen etwa 160 cm. Hierauf wurden 1,45 g Rohkristallinat, das nach DC aus den Glykosiden «A» und «B» bestand, mit 8 ml Me versetzt, das Ganze auf 60–70° erwärmt und mit 2 ml W und einigen Tropfen Chf versetzt. Durch weiteres Erwärmen konnte so eine klare Lösung erhalten werden, die – mit 400 ml W-gesättigtem E verdünnt – auf die Säule gebracht wurde. Eluierungsmittel: EW mit 2% Me; Durchlaufgeschwindigkeit 75 Tropfen pro Min.; Fr zu 200 ml. Die Fr 1–20 gaben 10 mg Eindampfrückstand, der verworfen wurde. Die Fr 21–26 enthielten total 300 mg (nach DC) reines «A». Die Rückstände aus den Fr 27–29 (= 150 mg) stellten Gemische von «A» und «B» dar. Die Fr 30–45 eluierten etwa 1 g nach DC einheitliches Glykosid «B». Das Glykosid «A» gab aus Me-Chf (ca. 1:1) feine Nadelchen vom Smp. 298–300° (Zers.), das Glykosid «B» aus demselben Lösungsmittelgemisch feine Nadelchen vom Smp. 259–261°.

1.1.4. *Aufteilung der ML des Rohkristallinates. – Vortrennung.* Zur Verfügung standen total 90 g Material (entsprechend 3 kg Blattpulver), das in Portionen von jeweils 5–12 g säulenchromatographisch aufgeteilt wurde. – *Beispiel:* 5 g ML in 15 ml warmem W aufgeschlämmt, wurden mit 15 g gereinigtem Hyflo Supercel [Helv. 36, 357 (1953)] gemischt, im Vakuum getrocknet, als pulveriger Rückstand auf eine Säule von 500 g Hyflo Supercel-W-(1:1) (mit MekW bereit) gegeben und auf dieser leicht festgedrückt. Die Dimensionen der fertigen Säule betragen 60 cm  $\times$  3,9 cm. Fr zu 100 ml (16–18 Tropfen/Min.). Zur Elution diente nur MekW. Die ersten 5 Fr gaben total 64 mg Eindampfrückstände (nicht weiter untersucht). Die Fr 6–9 eluierten nach DC (MekW) total 450 mg Gemische der Glykoside «A» und «B» sowie eine sehr unpolare, gelb gefärbte Substanz. Fr 10 (93 mg) enthielt «B» und «C» zu etwa gleichen Teilen, Fr 11–15 (688 mg) «C», Fr 16–31 (1,54 g) «C» und «D», Fr 32–52 (1,1 g) zur Hauptsache «D», Fr 53–101 (420 mg) zahlreiche polarere KEDDE-negative Substanzen, die nicht weiter untersucht wurden.

1.1.4.1. *Glykosid C. – Vorreinigung.* 10 g C-haltiges Material wurden in 40 ml Me gelöst, mit 450 ml E versetzt und über eine mit E bereitete Säule von 500 g  $\text{SiO}_2$ -W-(5:2) chromatographiert; Fr zu 500 ml. Fr 1–15 [Elutionsmittel E-Me-(49:1)] gaben 2,4 g Eindampfrückstände. Nach DC unpolare Substanzen als C (nicht weiter untersucht). Fr 16–45 [Elutionsmittel E-Me-(49:1) und -(97:3)] gaben total 5,6 g amorphes Material. Die späteren Eluate [bis E-Me-(47:3)] enthielten neben C etwas «G» und polarere Stoffe (nicht weiter untersucht).

*Haupttrennung.* Die bei der Vorreinigung erhaltenen 5,6 g rohes C wurden erneut an  $\text{SiO}_2$ -W-(5:2) aufgetrennt und diejenigen Fr, die nach DC [Chf-Me-W-(7:3:1)] zur Hauptsache die polarste Substanz enthielten, vereinigt und so oft an  $\text{SiO}_2$ -W-(5:2) aufgetrennt, bis schliesslich rund 2 g der Hauptsatz substanz resultierten, die nach DC einheitliches Glykosid C (34) darstellten. Aus Me-Ä 1 g Kristallinat. Sie wurden in Me-Chf-(1:1) gelöst, die Lösung stark eingengt und mit An versetzt: 780 mg feine Prismen vom Smp. 240–242°;  $[\alpha]_D^{23} = -41^\circ \pm 2^\circ$  (in Py). – Die Acetylverbindung 35 gab aus An-Ä feine, dicht verzilzte Nadelchen vom Smp. 223–231°;  $[\alpha]_D^{23} = -1,5^\circ \pm 2^\circ$  (in Chf).

1.1.4.2. *Glykosid «D».* 5 g rohe Substanz «D» [erhalten durch wiederholte Aufteilung der «D»-haltigen Fr der oben beschriebenen Vortrennung an Hyflo Supercel-W-(1:1) mit MekW] wurden in 10 ml Me aufgeschlämmt, mit 10 g Hyflo Supercel vermischt und im Vakuum vom Me befreit. Der trockene, pulverige Rückstand wurde auf eine Säule von 500 g  $\text{SiO}_2$ -W-(10:5,5) (mit E bereit) gegeben und leicht festgedrückt. Die Fr 1–8 (mit E) eluierten 80 mg Substanz (verworfen). Fr 9–35 [mit E-Me-(199:1)] gaben 630 mg rohes C, Fr 36–104 [mit E-Me-(99:1) und E-Me-(49:1)] 1,8 g C + «D», Fr 105–139 [mit E-Me-(19:1)] 400 mg (Gemische), Fr 140–180 [mit E-Me-(93:7) bis -(9:1)] 1,2 g «D», das nach DC noch wenig Verunreinigungen enthielt. Eine analog mit 7 g rohem «D» durchgeführte chromatographische Auftrennung gab weitere 1,5 g angereichertes «D». Aus Me-An 100 mg bzw. 120 mg feine Kristallnadelchen vom Smp. 259–263°;  $[\alpha]_D^{23} = -63^\circ \pm 2^\circ$  (in Py).

## 2. Untersuchung der isolierten genuinen Glykoside

2.1. *Glykosid «A».* – 2.1.1. *Enzymatische Spaltung: Monosid «e» (7) [2].* – 500 mg Glykosid «A» (1) vom Smp. 297–300° wurden in einem Gemisch von 10 ml Me, 75 ml An und 300 ml W leicht erwärmt, wobei eine schwach trübe Lösung resultierte. Nach dem Abkühlen auf 20° wurden 25 mg Fermentpräparat<sup>12)</sup>, gelöst in 2 ml W, zugegeben, mit einigen Tropfen Toluol versetzt und 48 Std. bei 37° stehengelassen. Nach Zugabe weiterer 12 mg Fermentpräparat (in 1 ml W) wurde noch-

mals 48 Std. bei 37° stehengelassen, wobei die Lösung völlig klar wurde. Sie wurde im Vakuum auf etwa 200 ml konzentriert und 5mal mit je 100 ml Chf extrahiert. Die Chf-Auszüge hinterliessen nach dem Waschen mit W, Trocknen über Sulfat, Filtrieren und Eindampfen im Vakuum 411 mg Rückstand. Dieser gab im DC [E-Pe-(4:1)] 1 Fleck (Rf-Wert wie das früher [2] isolierte *Monosid* «e»), im AgNO<sub>3</sub>-DC [Mek-Chf-Pe-(70:15:15)] dagegen 3 Flecke<sup>24)</sup>, wovon der mittlere (Canarigenin-canarosid) am stärksten war. Der beim «Hydrolysentest» [2] aus «e» gewonnene Geninanteil wurde in der AgNO<sub>3</sub>-DC [Chf-E-Me-(10:5:1)] untersucht und gab ebenfalls 3 Flecke mit den Rf-Werten des *Dianhydroperiplogenins* (aus Canarigenin entstanden), des *Uzarigenins* und des *Xysmalogenins*.

2.1.2. *Saure Hydrolyse des Glykosids «A»: Isolierung von Canarobiose (15)*. 140 mg «A» vom Smp. 303–306° wurden in 15 ml Me und 15 ml wässriger 0,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zunächst 15 Min. unter Rückfluss gekocht, bis die Lösung völlig klar war. Hierauf wurde noch weitere 40 Min. unter Rückfluss gekocht, anschliessend das Me im Vakuum verdampft und die wässrige, vom ausgefallenen Geningemisch etwas trübe Lösung (zur Spaltung der Methylglykoside) 1 Std. auf dem Dampfbad nachhydrolysiert. Die saure, wässrige Phase wurde dann 5mal mit je 20 ml Chf extrahiert, die Chf-Auszüge der Reihe nach jeweils 2mal mit W gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene gebracht: 72 mg rohes Geningemisch. (Im AgNO<sub>3</sub>-DC [System Chf-E-Me-(10:5:1)] ein Hauptfleck von *Dianhydroperiplogenin* (unpolarste Substanz), 2 schwächere Flecke der etwas polaren Substanzen *14-Anhydrouzarigenin* und *14-Anhydroxysmalogenin* und schliesslich noch 2 Flecke mit den kleinsten Rf-Werten, die denjenigen von *Uzarigenin* und *Xysmalogenin* entsprachen.) – Die saure, wässrige Phase der obigen Chf-Ausschüttelung wurde im Vakuum von Chf-Resten befreit und mit frisch aus Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung mit CO<sub>2</sub> gefälltem und mit heissem W gewaschenem BaCO<sub>3</sub> in der Wärme versetzt und durch ein mit wenig Hyflo Supercel gedichtetes Filter genutscht. Das klare Filtrat wurde mit einer Spatelspitze frischem BaCO<sub>3</sub> versetzt, im Vakuum ganz eingedampft, der Rückstand in W-haltigem An gelöst, dieses blank filtriert und das klare Filtrat im Vakuum eingedampft. Der beinahe farblose Rückstand (74 mg) zeigte im DC (An) 4 Flecke, deren Rf-Werte Methylcanarose, Canarose, Methylcanarobiose und Canarobiose entsprachen. Der rohe Zuckersirup wurde in 2 ml An, das einige Tropfen W enthielt, gelöst, mit 0,5 g SiO<sub>2</sub> verrührt, dieses im Vakuum getrocknet und auf eine Säule von 3 g SiO<sub>2</sub> gebracht, die mit Ä-Mischungen (8:1) bereitet worden war. Durch Zugabe steigender Mengen «Mischung» (bis reine «Mischung») liessen sich *Methylcanarose*, *Canarose* und *Methylcanarobiose* (als Gemische) vollständig eluieren (total 20 mg). Mit An-W-(9:1) wurde in 2 Fr die in der Säule verbliebene *Canarobiose* herausgelöst: 54 mg Sirup, der nach DC (An) einheitlich war. Aus An-W 32 mg feine, weisse Blättchen von **15** vom Smp. 205–210°. – (*Enzymatische Spaltung der Canarobiose*: 1 mg Kristalle wurde in 1 Tropfen W gelöst, mit 1 Tropfen W, das eine Spur des Fermentpräparates<sup>12)</sup> enthielt, versetzt und 16 Std. bei 37° stehengelassen. Im DC [An-Chf-(2:1) und E] 2 Flecke: *Canarose* und *Glucose*.)

2.1.3. *Auftrennung des Acetylierungsproduktes von «A»*. 2,75 g der amorphen Acetylverbindung von «A» (im AgNO<sub>3</sub>-DC [Chf-An-Me-(90:9:1)] 2 Flecke) wurden unter Erwärmen in 50 ml eines Gemisches von E-Pe-(1:1) mit 3% Me gelöst und auf eine Säule von 900 g AgNO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub><sup>25)</sup>, die mit E-Pe-(1:1) mit 3% Me<sup>26)</sup> bereitet worden war, gebracht. Die Ausmasse der fertigen AgNO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>-Säule betragen 3,5 cm × 180 cm. Durchlaufgeschwindigkeit 40 Tropfen pro Min.; Fr zu 45 ml; Eluierungsmittel E-Pe-(1:1) mit 3% Me. Fr 1–44 20 mg (verworfen); Fr 4 593 mg einheitliche *Acetylverbindung* von A<sub>1</sub> (**3**); Fr 46–50 630 mg Gemisch von **3** und **5**; Fr 51–56 1,9 g *Acetylverbindung* von A<sub>2</sub> (**5**); Fr 57–63 95 mg **5** und eine polare Substanz (Acetylprodukt des Glykosids «B»). Das nach Rechromatographie der Fr 45–50 gewonnene **3** gab aus An-Ä 200 mg feine Plättchen vom Smp. 212–219°;  $[\alpha]_D^{25} = -18^\circ \pm 2^\circ$  (Chf). **5** kristallisierte aus An-Ä ebenfalls in feinen Plättchen (1060 mg) vom Smp. 200–210°;  $[\alpha]_D^{25} = -23^\circ \pm 2^\circ$  (Chf).

<sup>24)</sup> Der Fleck des Uzarigenin-canarosids setzt sich dabei immer deutlich von demjenigen der beiden Canaroside des Canarigenins und Xysmalogenins ab. Letztere überlappen sich oft etwas.

<sup>25)</sup> 750 g SiO<sub>2</sub> wurden in einer Pulverflasche allmählich mit der Lösung von 75 g AgNO<sub>3</sub> in 75 ml W versetzt, kräftig durchgeschüttelt und 16 Std. bei 20° stehengelassen.

<sup>26)</sup> Dieses Lösungsmittelgemisch eignet sich gut für die Säulenchromatographie, da damit kaum AgNO<sub>3</sub> miteluert wird.

2.1.4. *Glykosid A<sub>1</sub> (2) aus 3*. 165 mg **3** vom Smp. 212–219° wurden in 10 ml Me gelöst, mit 5 ml 10-proz. wässriger NH<sub>3</sub>-Lösung versetzt und 18 Std. bei 20° stehengelassen. Nach dieser Zeit enthielt die Reaktionslösung nach DC [E-Me-W-(8:1:1)] zur Hauptsache freies Glykosid A<sub>1</sub> (**2**). Nach dem Neutralisieren mit verd. HCl wurde das Me im Vakuum weggedampft, wobei **2** ausfiel. Es wurde abgesaugt, mit W gewaschen und getrocknet: 120 mg. Diese wurden in E-Me-W-(8:1:1) gelöst, über eine Säule 1,8 cm × 45 cm von 50 g SiO<sub>2</sub>-W-(50:5), die mit demselben Lösungsmittelgemisch bereit worden war, verteilt. Durchlaufgeschwindigkeit 14 Tropfen pro Min.; Fr zu 8,5 ml. Die Hauptmenge an **2** war in den Fr 8–60 enthalten. Die vereinigten Eindampfrückstände wurden aus Me-Chf kristallisiert: 78 mg feine Nadelchen des *Glykosids A<sub>1</sub> (2)* vom Smp. 308–309° (Zers.);  $[\alpha]_D^{25} = -53^\circ \pm 2^\circ$  (Py).

2.1.5. *Glykosid A<sub>2</sub> (4) aus 5*. 900 mg vom Smp. 185–197° [nach AgNO<sub>3</sub>-DC (Chf-An-Me-(80:10:1)) einheitlich] wurden in 50 ml Me gelöst, mit 25 ml 10-proz. wässriger NH<sub>3</sub>-Lösung versetzt und 18 Std. bei 20° stehengelassen. (Nach 15 Std. war nach DC nur noch eine Spur der Monoacetylverbindung in der Reaktionslösung enthalten.) Aufarbeitung analog wie unter Glykosid A<sub>1</sub> beschrieben. Das trockene Rohprodukt wurde aus Me-Chf kristallisiert und gab 480 mg feine Nadelchen des *Glykosids A<sub>2</sub> (4)* vom Smp. 287–289° (Zers.);  $[\alpha]_D^{25} = -67^\circ \pm 2^\circ$  (Py).

2.1.6. *Enzymatische Spaltung von Glykosid A<sub>1</sub>: Uzarigenin-canarosid = Monosid e<sub>1</sub> (8)*. 50 mg A<sub>1</sub> vom Smp. 308–309° wurden in 1 ml Me, 8 ml An und 35 ml W suspendiert, mit der Lösung von 10 mg Fermentpräparat<sup>12)</sup> in einigen Tropfen W versetzt und bei 37° stehengelassen. Nach Zugabe weiterer 5 mg Enzympräparat wurde noch weitere 30 Std. bei 37° fermentiert. Hierauf war im DC (MekW) kein Ausgangsmaterial mehr nachweisbar. Die Fermentierungslösung wurde im Vakuum von An und Me befreit und zunächst 4mal mit Chf, dann noch 4mal mit Chf-Alk-(4:1) extrahiert. Beide Extrakte enthielten nach DC [Mek-Pe-Chf-(70:15:15)] nur Monosid. Aus Me-Ä 32 mg feine Nadelchen von **8** vom Doppel-Smp. 145–150°/240–248°. Im DC und im AgNO<sub>3</sub>-DC [beide im System Mek-Pe-Chf-(70:15:15)] identische Rf-Werte wie Uzarigenin-canarosid aus *I. isabelliana* [8].

2.1.7. *Saure Hydrolyse von Glykosid A<sub>1</sub>: Canarobiose (15) und Uzarigenin (30)*. 2 mg A<sub>1</sub> wurden in 0,2 ml Me gelöst, mit 0,2 ml 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt und 1 Std. auf 90° erwärmt. Nach Verdampfen des Me im Vakuum wurde die verbliebene wässrige Lösung während 45 Min. bei 90° nachhydrolysiert, abgekühlt, 3mal mit Chf extrahiert und dieses wie üblich aufgearbeitet: Geninteil. Die wässrige Phase wurde mit frisch gefälltem BaCO<sub>3</sub> neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingedampft: Zuckerteil. Der Genianteil bestand nach DC und nach AgNO<sub>3</sub>-DC [beide im System E-Chf-Me-(5:10:1)] zur Hauptsache aus Uzarigenin. Der Zuckerteil enthielt nach DC (An) zur Hauptsache Canarobiose, wenig Canarobiose-methylglykosid und eine Spur Canarose.

2.1.8. *Enzymatische Spaltung von Glykosid A<sub>2</sub>: Canarigenin-canarosid = Monosid e<sub>2</sub> (10)*. 165 mg A<sub>2</sub> vom Smp. 287–289° (Zers.) wurden in 7 ml Me und 30 ml An gelöst, mit der Lösung von 15 mg Fermentpräparat<sup>12)</sup> in 120 ml W versetzt und bei 37° stehengelassen. Nach 48 Std. war nach DC (MekW) alles Glykosid A<sub>2</sub> gespalten. Aufarbeitung, wie unter Fermentierung des Glykosids A<sub>1</sub> beschrieben, gab (wobei etwa 20% verloren gingen) aus Me-Ä total 71 mg **10** in Nadeln vom Smp. 140–148°. Nach AgNO<sub>3</sub>-DC [Mek-Pe-Chf-(70:15:15)] einheitlich. Aus An-Ä umkristallisiert: 53 mg, Smp. 141–145°;  $[\alpha]_D^{27} = -35^\circ \pm 2^\circ$  (Me). – *Acetylverbindung 11*. 36 mg krist. ML und 8 mg Kristalle von **10** wurden in Py-Ac<sub>2</sub>O 16 Std. bei 37° acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung: 55 mg rohe Acetylverbindung **11**, aus An-Ä 28 mg Kristalle vom Smp. 230–245°. Nach dem Umlösen aus Me-Ä 12 mg feine, weisse Nadeln vom Smp. 244–248°;  $[\alpha]_D^{26} = -23,6^\circ \pm 3^\circ$  (Chf). Im AgNO<sub>3</sub>-DC [Cy-An-(5:3) mit 1% Me] ein Hauptfleck sowie ein ganz schwacher Fleck der etwas weniger polare Acetylverbindung **9**.

2.1.9. *Saure Hydrolyse des Glykosids A<sub>2</sub>: Canarobiose (15) und Dianhydroperiplogenin (14)*. 105 mg **4** vom Smp. 287–289° (Zers.) wurden in 10 ml Me und 10 ml 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter Rückfluss gekocht, wobei nach 5 Min. eine völlig klare Lösung resultierte. Nach 55 Min. wurde abgekühlt, das Me im Vakuum entfernt, die wässrige Lösung auf dem Dampfbad noch 60 Min. nachhydrolysiert und nach dem Abkühlen mit Chf extrahiert. Übliche Aufarbeitung der Chf-Lösung gab 52 mg Genianteil. Die wässrige Phase wurde mit frisch gefälltem BaCO<sub>3</sub> neutralisiert, filtriert und im Vakuum vorsichtig eingedampft: 56 mg Zuckerteil. Der Geninteil gab im AgNO<sub>3</sub>-DC einen grossen Fleck von Dianhydroperiplogenin (durch Hydrolyse aus Canarigenin entstanden) und einen kleinen Fleck, der im Rf-Wert dem Uzarigenin (**30**) entsprach. Der Zuckerteil wurde in 0,1 ml W gelöst,

mit 0,2 ml An versetzt und 16 Std. bei 0° stehengelassen: 12 mg kristallisierte Canarobiose, Smp. 212–216°. Im DC (An) einheitlich. Die ML gab im DC (An) 2 gleich grosse Flecke von Canarobiose-methylglykosid und Canarobiose, neben wenig Canarose.

2.1.10. *Xysmalogenin-canarosid (12) aus Monosid «e»*. 500 mg Monosid «e» wurden in 70 ml An und 30 ml W gelöst, mit 1 ml AcOH versetzt und 7 Tage bei 37° stehengelassen. Da nach dieser Zeit nur sehr wenig des eingesetzten Monosids «e» gespalten war, wurde 1 ml 10-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugesetzt. Nach 36 Std. bei 37° war nach AgNO<sub>3</sub>-DC fast alles Canarigenin-canarosid gespalten. Im Vakuum wurde bei 37° vom An befreit, die wässrige Lösung (enthält die Canarose) mit Chf extrahiert, die einzelnen Chf-Auszüge 2mal mit W gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft. Der Rückstand (424 mg) wurde über 15 g neutralem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert (Fr zu 20 ml). Mit Bz-Chf-Gemischen, reinem Chf und Chf-Me-(99:1) wurden total 246 mg Genine eluiert (zunächst Dianhydroperiplogenin (14), später Gemische von 14 und Uzarigenin, Canarigenin, epi-Canarigenin [2] und Xysmalogenin). Mit Chf-Me-(9:1) und -(4:1) wurde ein Glykosidgemisch erhalten (146 mg), das im AgNO<sub>3</sub>-DC [Mek-Chf-Pe-(70:15:15)] bei schwachem Erhitzen 3 Flecke gab (in der Reihenfolge zunehmender Polarität): kleiner hellblauer Fleck (erscheint zuerst) (Uzarigenin-canarosid), kleiner rotvioletter Fleck (Canarigenin-canarosid) und grösserer grüner Fleck (Xysmalogenin-canarosid). Die 146 mg Glykosidgemisch wurden zur Entfernung des Canarigenin-canarosids in 20 ml An und 10 ml W gelöst, mit 0,3 ml 10-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt, 30 Std. bei 37° stehengelassen und hierauf analog wie bei der ersten Hydrolyse aufgearbeitet: 125 mg Gemisch. Nach AgNO<sub>3</sub>-DC [Mek-Chf-Pe-(70:15:15)] Dianhydroperiplogenin, Xysmalogenin, Uzarigenin-canarosid und Xysmalogenin-canarosid. Dieses Genin-Glykosid-Gemisch (125 mg) wurde über eine mit Chf-Isop-(19:1) bereitete Säule von AgNO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> chromatographiert (76 g SiO<sub>2</sub> wurden in einer Pulverflasche unter kräftigem Schütteln mit der Lösung von 7,5 g AgNO<sub>3</sub> in 7,5 ml W versetzt und hierauf 16 Std. bei 120° getrocknet); Fr zu 10 ml, Durchlaufgeschwindigkeit des Chf-Isop-(19:1)-Gemisches 30 Tropfen pro Min. Die einzelnen Fr wurden vor dem Eindampfen zur Entfernung des miteluierten AgNO<sub>3</sub> jeweils mit W gewaschen!! Die Fr 1–122 eluierten gesamthaft 51 mg Genine. Einige dieser Fr, die nach AgNO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> nur Xysmalogenin enthielten, gaben nach dem Eindampfen total 14 mg 32 (roh). Aus Me 6 mg reines *Xysmalogenin* vom Smp. 235–250°. Aus den Fr 123–140 konnten 11 mg *Uzarigenin-canarosid* (nach AgNO<sub>3</sub>-DC einheitlich) gewonnen werden. Aus Chf 4 mg Nadelchen vom Smp. 232–236°. Die Fr 141–178 enthielten 40 mg Gemisch der Canaroside von Uzarigenin und Xysmalogenin (ca. 1:2) und die Fr 179–291 40 mg *Xysmalogenin-canarosid* (etwas gelb gefärbt). Dieses wurde in Chf aufgenommen, durch wenig Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft: 17 mg gelb gefärbter Rückstand (verworfen). Hierauf wurde das Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit Chf-Me-(1:1) extrahiert. Der Eindampfrückstand (weisser Schaum) wog 23 mg. Aus Me 20 mg feine Nadelchen von *Xysmalogenin-canarosid (12)*, Smp. 241–244°. Der «Hydrolysetest» [2] gab als einziges Genin *Xysmalogenin* [nach AgNO<sub>3</sub>-DC (Chf-E-Me-(10:5:1))]. Der beim «Hydrolysetest» gewonnene Zuckerteil bestand nach DC [An-Chf-(2:1)] nur aus *Canarose*.

2.2. *Glykosid «B»*. – 2.2.1. *Saure Hydrolyse des Glykosids «B»: Isolierung von Digilanidobiose (29)*. 200 mg Glykosid «B» wurden in 20 ml Me und 20 ml 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 Min. auf dem Dampfbad unter Rückfluss erhitzt. Nach Verjagen des Me im Vakuum wurde die wässrige Lösung noch 40 Min. auf dem Dampfbad nachhydrolysiert und anschliessend 3mal mit je 30 ml Chf extrahiert. Die Chf-Auszüge passierten 2 Scheidetrichter mit Wasser, wurden dann über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft: 106 mg Geninteil. Nach AgNO<sub>3</sub>-DC [Chf-E-Me-(10:5:1)] *Dianhydroperiplogenin (14)*, 2 schwache polarere Flecke (14-Anhydrogenine?), *Uzarigenin (30)* und *Xysmalogenin (32)*. Die wässrige, mit Chf ausgeschüttelte Lösung wurde mit frisch gefälltem und gut ausgewaschenem BaCO<sub>3</sub> in der Wärme neutralisiert, durch ein mit BaCO<sub>3</sub> gedichtetes Filter blank filtriert und bei vermindertem Druck zum Sirup eingedampft: 94 mg. Im DC (An) *Digilanidobiose (29)*<sup>27)</sup>. Aus Me-W 78 mg feine, weisse Nadelchen vom Smp. 213–217°. Nach dem Umlösen aus Me-W 35 mg Kristalle vom Smp. 218–223°.

2.2.2. *Isolierung von Uzarigenin-digitoxosid = Monosid d<sub>1</sub> (23)*. 1,05 g Monosid «d» wurden in 20 ml Chf gelöst, mit 30 ml einer Lösung von Monoperphtalsäure in Ä (43 mg/ml) versetzt und bei 20° stehengelassen. Nach 4½ Std. wurde der Ä im Vakuum verdampft, 20 ml W zugegeben und

<sup>27)</sup> Wir danken Herrn Dr. A. von WARTBURG bestens für die Überlassung einer Vergleichsprobe dieser Substanz.

das Reaktionsprodukt durch 3maliges Ausschütteln mit je 20 ml Chf isoliert. Die Chf-Extrakte wurden der Reihe nach 1mal mit 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 2mal mit 15 ml W gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde an 230 g SiO<sub>2</sub> chromatographiert. Eluierungsmittel Chf-Alk-(50:3); 1 Fr zu 22 ml pro Std. Fr 1–71 enthielten total 3 mg Substanz (verworfen). Die Fr 72–84 gaben im ganzen 52 mg Eindampfrückstand: *Uzarigenin-digitoxosid* (**23**). Aus An-Ä Nadelchen vom Smp. 228–235°; Misch-Smp. mit authentischem Uzarigenin-digitoxosid = Monosid c<sub>1</sub> aus *I. isabelliana* [8]: 229–245°; Vergleich im DC ergab völlige Übereinstimmung mit **23**. (Die späteren Fr enthielten die *Epoxyde* von **25** und **27**.) – Die *Acetylverbindung* (farblose Nadeln nach 2maligem Umlösen aus An-Ä) schmolz bei 245–252°; Misch-Smp. mit authentischer Acetylverbindung **24** [8]: 245–250°. Die Probehydrolyse gab nach DC [Chf-Me-(97:3)] nur *Uzarigenin*.

2.2.3. *Canarigenin-digitoxosid* = Monosid d<sub>2</sub> (**25**). 1,0 g Monosid «d» [2] vom Smp. etwa 170–214° wurde unter Lichtschutz an AgNO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> chromatographiert (450 g SiO<sub>2</sub> mit 50 g AgNO<sub>3</sub> in 50 ml W, gut durchgemischt und 60 Std. im Dunkeln bei 20° stehengelassen; Endgewicht 532 g). Höhe der Säule: 60 cm, Durchmesser 4 cm; Lösungsmittel: Chf-Isop-(19:1). Fr zu 100 ml; jede Fr wurde vor dem Eindampfen im Vakuum 2mal mit W ausgeschüttelt. (*Probehydrolyse*: etwa 1 mg des Eindampfrückstandes wurde im Glühröhrchen in 2 Tropfen An gelöst, mit 1 Tropfen 0,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt, im Wasserbad 40 Min. auf 80° erwärmt und das An jeweils ergänzt. Nach dem Erkalten wurde mit 2 Tropfen Chf ausgeschüttelt, die Chf-Phase mit einer Kapillare aufgezogen und direkt im AgNO<sub>3</sub>-DC [Chf-E-Me-(10:5:1)] untersucht.) Fr 45–49 315 mg; Probehydrolyse: zur Hauptsache *Dianhydroperiplogenin* (**14**), wenig *Xysmalogenin* (**32**). Fr 50–57 420 mg; Probehydrolyse: gab neben **14** etwas mehr *Xysmalogenin* als die Hydrolyse der Eindampfrückstände der Fr 45–49. – Die aus den Fr 45–49 gewonnene Substanz wurde nochmals wie oben an 250 g AgNO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> chromatographiert. Höhe der Säule: 60 cm, Durchmesser 3,2 cm; Fr zu 40 ml. – Fr 60–69 176 mg; Probehydrolyse: *Dianhydroperiplogenin* und Spuren *Xysmalogenin* (nur im UV.-Licht sichtbar). Aus An-Ä 152 mg, Umlösen aus Me-Ä gab 131 mg prismatische Plättchen von *Canarigenin-digitoxosid* (**25**), Smp. 210–218°. Nach AgNO<sub>3</sub>-DC [Mek-Chf-Pe-(70:15:15)]<sup>28)</sup> einheitlich. Nach Probehydrolyse zeigt der Geninanteil (*Dianhydroperiplogenin*) im AgNO<sub>3</sub>-DC im UV.-Licht immer noch eine Spur *Xysmalogenin*. – Die *Acetylverbindung 26* des Monosids d<sub>2</sub> gab aus An-Ä zunächst Kristalle vom Smp. 195–199°, nach dem Umlösen aus Me-Ä weisse Nadeln vom Smp. 190–194°.

2.2.4. *Isolierung von Xysmalogenin* (**32**). 1 g Monosid «d» vom Smp. etwa 207–214° wurde, in 100 ml An und 50 ml W gelöst, mit 1,5 ml 10-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 37° stengelassen. Nach 26 Std. war im AgNO<sub>3</sub>-DC [E-Pe-(4:1)] alles Monosid «d» gespalten. Nach Verdampfen des An im Vakuum und 3maligem Ausschütteln der verbliebenen wässrigen Lösung mit je 100 ml Chf wurden die Chf-Auszüge mit W gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft: 794 mg Trockenrückstand. Dieser wurde über 30 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (regeneriert, pH etwa 6,1) chromatographiert. (Die mit Bz-Chf-(3:2) eluierten Fr 1–10 enthielten 278 mg *Dianhydroperiplogenin*; aus Me 178 mg Kristalle vom Smp. 189–200°, die nach dem Umlösen aus Me 134 mg Kristalle vom Smp. 187–203° gaben. Der Eindampfrückstand der mit Bz-Chf-(2:3) erhaltenen Fr 11–18 (29 mg) war ein Gemisch von *Dianhydroperiplogenin* und 14-Anhydrogeninen.) Mit Bz-Chf-(1:4)-Gemisch wurden total 190 mg Gemische von *Uzarigenin*, *Canarigenin* und *Xysmalogenin* eluiert. Die Fr 27–30 mit Bz-Chf-(1:4) enthielten 40 mg rohes *Xysmalogenin*, das wenig *Canarigenin* enthielt. Aus Me 16 mg kristallisiertes *Xysmalogenin* vom Smp. 250–262° (enthielt nach AgNO<sub>3</sub>-DC noch eine Spur *Canarigenin*). Mit Chf (Fr 31–34) wurde ein Gemisch (total 44 mg) von der Säule gelöst, das nach AgNO<sub>3</sub>-DC zur Hauptsache aus *Xysmalogenin* bestand (daneben noch etwas *Canarigenin* und wenig unpolare Stoffe).

<sup>28)</sup> *Uzarigenin-digitoxosid* (**23**) setzt sich dabei vom *Canarigenin-digitoxosid* (**25**) und *Xysmalogenin-digitoxosid* (**27**) gut ab. **25** und **27** lassen sich im AgNO<sub>3</sub>-DC nicht unterscheiden, wenn **25** stark überwiegt. Gemische von **23**, **25**, **27** im Verhältnis von etwa (1:1:1) lassen sich aber sehr gut nebeneinander erkennen: beim Erhitzen des besprühten AgNO<sub>3</sub>-DC-Plättchens erscheint **23** als erste (unpolarste) Substanz mit hellblauer Farbe. Dann wird das stärker polare **25** sichtbar (zunächst rotviolett, dann blauviolett) und schliesslich erscheint **27** unmittelbar an **25** angrenzend mit grünblauer Farbe. Nach längerem Erhitzen werden alle Flecke braun.

**2.3. Glykosid C = Canarigenin-glucosido-fucosid (34).** – 2.3.1. *Enzymatische Spaltung mit Fermentpräparat*<sup>29)</sup>: Canarigenin (38), D-Fucose (40) und Glucose. 200 mg Glykosid C wurden in 7,5 ml An und 30 ml W gelöst, mit 20 mg Fermentpräparat in einigen Tropfen W versetzt und 5 Tage bei 37° stehengelassen. Nach Verdampfen des An im Vakuum wurde mit Chf extrahiert: 103 mg rohes Genin. Aus An 72 mg reines Canarigenin vom Smp. 208–222°;  $[\alpha]_D^{24} = +41^\circ \pm 3^\circ$  (Chf<sup>29)</sup>. (Im AgNO<sub>3</sub>-DC [Chf-E-Me-(10:5:1)] nur ein Fleck.) Eine Probe wurde 30 Min. in Me-0,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-(1:1) erhitzt. Im AgNO<sub>3</sub>-DC nur ein Fleck von Dianhydroperiplogenin. Die mit Chf erschöpfend extrahierte wässrige Lösung wurde im Vakuum bei 50° eingengt: 130 mg roher Zucker (enthielt noch das Ferment). Er wurde in wenig «Mischung» gelöst, mit wenig SiO<sub>2</sub> verrieben, dieses im Vakuum getrocknet und auf eine mit Ä-«Mischung»-(9:1) bereitete Säule von 5 g SiO<sub>2</sub> gegeben; Fr zu 5 ml. Fr 1–10 mit Ä-«Mischung»-(9:1) und Fr 11–30 mit Ä-«Mischung»-(4:1) gaben keine Eindampfrückstände. Die Fr 31–75 mit Ä-«Mischung»-(4:1) lieferten total 38 mg Rückstand = rohe Fucose, die Fr 76–90 2 mg Gemisch, die Fr 91–100 mit Ä-«Mischung»-(3:1) 3 mg Gemisch und die Fr 101–120 mit Ä-«Mischung»-(7:3) 40 mg Glucose, die nach DC (An) eine Spur Fucose enthielt. Der rohe Fucosesirup (38 mg) wurde 24 Std. im Vakuumexsiccator getrocknet. Aus W-freiem Alk-An 12 mg Kristalle vom Smp. 125–135° und 4 mg vom Smp. 125–132°. Die 16 mg Kristalle waren nach DC (An) rein und gaben nach dem Umlösen aus Alk-An 7 mg krist. D-Fucose (feine Prismen) vom Smp. 133–139°;  $[\alpha]_D^{25} = +80,1^\circ$  (in W nach 30 Min.) bzw.  $+72,4^\circ \pm 5^\circ$  (in W nach 14 Std.). Der Nachweis der Glucose geschah im DC.

2.3.2. *Enzymatische Spaltung mit Strophanthobiase: Canarigenin-fucosid (36)*. – 100 mg Glykosid C vom Smp. 240–242° wurden in 5 ml An und 20 ml W gelöst, mit 25 mg Strophanthobiase in einigen Tropfen W versetzt und bei 37° stehengelassen. Nach 7 Tagen wurde das An im Vakuum entfernt und die wässrige Phase mit Chf extrahiert: 20 mg Monosid, das eine Spur Canarigenin enthielt. Die wässrige Lösung wurde mit 10 mg Strophanthobiase in einigen Tropfen W versetzt und nach 5 Tagen wiederum mit Chf ausgeschüttelt. Dieses Procedere wurde nochmals wiederholt. Nach total 23 Tagen betrug die Gesamtausbeute an rohem Monosid 36 59 mg. Der mit Chf erschöpfend extrahierten wässrigen Lösung liessen sich durch Ausschütteln mit Chf-Alk-(4:1) noch 18 mg Glykosid C entziehen. – Das rohe Monosid 36 kristallisierte nicht. Es wurde deshalb über eine mit Chf bereitete Säule von 2 g SiO<sub>2</sub> chromatographiert. Die Fr mit Chf-Me-(49:1) und die ersten Fr mit Chf-Me-(19:1) hinterliessen nach dem Eindampfen 10 mg rohes Canarigenin (das eine Spur Dianhydroperiplogenin enthielt). Die späteren Fr mit Chf-Me-(49:1) eluierten 39 mg Monosid 36. Aus An-Ä 20 mg zu Rosetten vereinigte Nadelchen vom Smp. 215–220°;  $[\alpha]_D^{23} = -8,1^\circ \pm 3^\circ$  (Chf). Nach DC [Chf-Me-(85:15)] einheitlich. – *Acetylverbindung 37*. 15 mg Monosid 36 wurden in 0,5 ml Py und 0,3 ml Ac<sub>2</sub>O bei 37° acetyliert: 18 mg rohes 37. Aus Me-Ä und wenig Pe 11 mg Nadelchen vom Smp. 234–238°; nach dem Umlösen aus Me-Ä 10 mg vom Smp. 232–239°;  $[\alpha]_D^{23} = +6,8^\circ \pm 3^\circ$  (Chf).

**2.4. Glykosid «D».** – Siehe Theoretischer Teil 2.4.

### 3. Bestimmung der Ringgrösse der Zucker im Monosid «d», «e» und Uzarigenin-canarosid

Je 10 mg der 3 Glykoside (bzw. 3 mg Digitoxose) wurden in 0,3 ml Dioxan gelöst. Nach Zugabe von 0,3 ml Me wurde mit 10 mg Natriummetaperjodat (bzw. 9 mg) in 0,6 ml W (bzw. 0,3 ml) versetzt, 15 Std. bei 20° und nach Zugabe von 6 mg NaBH<sub>4</sub> in 0,3 ml W noch weitere 4 Std. bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde 0,6 ml 1N HCl (bzw. 0,3 ml) zugefügt, 15 Min. auf dem Dampfbad erhitzt und die Reaktionslösung direkt im DC (E mit 1% Me) im Vergleich mit Propylenglykol untersucht (Anfärbung siehe [26]). Die dem Propylenglykol entsprechenden weissen Flecke hoben sich sehr deutlich und stark vom blauen Untergrund ab und waren für alle 3 Glykoside und die Digitoxose gleich stark ausgeprägt. Ein analog durchgeführter Versuch mit nur 3 mg Monosid

<sup>29)</sup> Für Canarigenin hatten wir früher [2] den Smp. 235–252° angegeben. Dieses Präparat zeigte jetzt den Smp. 234–250°, enthielt aber – wie wir nun durch AgNO<sub>3</sub>-DC feststellten – noch eine Spur Xysmalogenin. Tschesche *et al.* [9] fanden für ihr aus Chf-Bz kristallisiertes Canarigenin den Smp. 192–196° und  $[\alpha]_D^{21} = +46^\circ$  (Chf). Der von uns früher [2] bestimmte Wert für  $[\alpha]_D$  betrug  $+22^\circ$  und wurde in Me ermittelt (nicht in Chf, wie dort irrtümlicherweise im exper. Teil angegeben).

«d», wobei jeweils kleinere Mengen an Lösungsmitteln und Reagentien verwendet wurden, gestattete ebenfalls, das gebildete Propylenglykol noch mit Sicherheit im DC nachzuweisen.

#### 4. Ermittlung des Canarigenin-2-desoxyglykosid-Gehaltes

5 g (genau gewogen) trockenes, fein gemahlene Blattpulver wurden mit 3 g Hyflo Supercel und 10 g gewaschenem Seesand gleichmässig mit Alk befeuchtet und portionenweise unter leichtem Festdrücken in eine Chromatographiesäule eingefüllt. Hierauf wurde im Wärmekasten bei 50° mit total 100 ml Alk perkoliert (ca. 24 Std.). Der dunkelgrün gefärbte Extrakt wurde im Vakuum zur Trockene gebracht, in 20 ml An aufgenommen, mit 20 ml 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt und 30–40 Min. auf 80° erwärmt. Hierauf wurde im Vakuum von An befreit und die wässrige Lösung 5mal mit je 20 ml Chf extrahiert. Die Chf-Auszüge wurden nach dem Waschen mit W über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft. Der Rückstand, der zwischen 260 und 300 mg wog, wurde über eine mit Bz bereitete Säule von 5 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert (Fr zu 50 ml). Die ersten beiden Fr mit reinem Bz gaben jeweils etwa 120 mg stark grün gefärbten Rückstand, der frei von Dianhydroperiplogenin war. Die nächsten 4 Fr [Bz-Chf-(9:1), -(4:1), -(3:2) und -(3:7)] enthielten nach DC [E-Pe-(4:1)] alles Dianhydroperiplogenin und etwas Chlorophyll. Sie wurden vereinigt, im Vakuum zur Trockene gebracht, in 20,0 ml Alk gelöst und 1,0 ml dieser Lösung mit Alk zu 200 ml ergänzt. Aus der Extinktion dieser Verdünnung bei 226 nm [19] (gegen reines Dianhydroperiplogenin als Standard) liess sich die Menge des bei der Hydrolyse gebildeten Dianhydroperiplogenis ermitteln.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Aus den getrockneten Blättern von *Isoplexis canariensis* liess sich nach leichter Abänderung des früher [2] beschriebenen Verfahrens in etwa 1% Ausbeute ein Kristallinat gewinnen, das aus den zwei Glykosidgemischen «A» und «B» im ungefähren Verhältnis 1:4 besteht. Diese unterscheiden sich nur im Zuckerteil – Canarobiose beim Glykosid «A» und Digilanidobiose beim Glykosid «B» – und besitzen die gleichen Aglykone: Uzarigenin, Canarigenin und Xysmalogenin. – 2 der 3 Komponenten des Glykosids «A», nämlich Uzarigenin-glucosido-canarosid und Canarigenin-glucosido-canarosid, konnten als einheitliche Kristallisate gewonnen und in die Desglucoprodukte übergeführt werden. Das der 3. Komponente des Glykosids «A» entsprechende Desglucoprodukt, das Xysmalogenin-canarosid, liess sich aus dem Monosidgemisch «e» [2] (das aus «A» durch enzymatische Hydrolyse entsteht) gewinnen. – Das Glykosid «B» konnte bisher noch nicht in seine 3 Komponenten aufgeteilt werden. Aus seinem Monosidgemisch «d» wurden Uzarigenin-digitoxosid sowie Canarigenin-digitoxosid als einheitliche Glykoside und, nach saurer Hydrolyse, Xysmalogenin, das Aglykon des dritten Digitoxosids von «d», gewonnen. – Aus den Mutterlaugen der Glykosidgemische «A» und «B» konnten noch die Substanzen C und «D» erhalten werden. C ist Canarigenin-glucosido-fucosid, während «D» ein Gemisch mehrerer Glykoside darstellt.

Pharmazeutisches Institut der Universität Basel

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. WERNER, *Wissensch. Z. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Mathem.-Naturw. Reihe* 13, 453 (1964).
- [2] P. STUDER, S. K. PAVANARAM, C. R. GAVILANES, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* 46, 23 (1963).
- [3] A. G. GONZÁLEZ, *Internationaler Kongress für reine und angewandte Chemie, Zürich 1955, Referatenband XIV*, S. 160; A. G. GONZÁLEZ & R. CALERO, *Anales real Soc. españ. Física Quím. (Madrid)* 51 B, 283, 341 (1955); *Chem. Abstr.* 49, 12783 (1955); 50, 3482 (1956).
- [4] J. L. BRETÓN, J. DELGADO & A. G. GONZÁLEZ, *Chemistry & Ind.* 1959, 513; A. G. GONZÁLEZ, J. L. BRETÓN-FUNES & J. D. BENÍTEZ, *Anales real Soc. españ. Física Quím. (Madrid)* 56 B, 85 (1960); *Chem. Abstr.* 54, 19757 (1960).

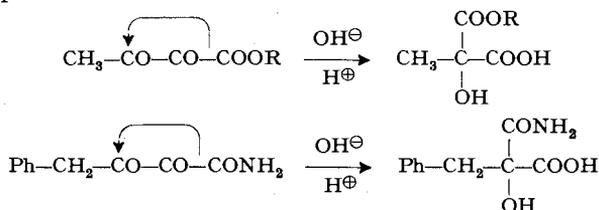
- [5] R. TSCHESCHE, W. FREYTAG & G. SNATZKE, Chem. Ber. *92*, 3053 (1959).  
 [6] T. GOLAB, HERB. JÄGER & T. REICHSTEIN, Helv. *43*, 2035 (1960); frühere Lit. s. daselbst.  
 [7] J. POLONIA, H. KURITZKES, HERB. JÄGER & T. REICHSTEIN, Helv. *42*, 1437 (1959); frühere Lit. s. daselbst.  
 [8] H. FREITAG, SIGRID SPENGLER, H. H. A. LINDE & K. MEYER, Helv. *50*, 1336 (1967).  
 [9] R. TSCHESCHE, G. SNATZKE, J. DELGADO & A. G. GONZÁLEZ, Liebig's Ann. Chem. *663*, 157 (1963).  
 [10] P. BELLET, Ann. pharmaceut. franç. *8*, 471 (1950); M. PESEZ, *ibid.* *10*, 104 (1952).  
 [11] D. L. KEDDE, Pharmac. Weekbl. *82*, 741 (1947).  
 [12] J. D. BENÍTEZ, A. G. GONZÁLEZ & F. G. JEREZ, Anales real Soc. españ. Física Quím. (Madrid) *61 B*, 551 (1965); Chem. Abstr. *63*, 14962 (1965).  
 [13] F. KAISER, Chem. Ber. *88*, 556 (1955).  
 [14] T. REICHSTEIN & H. ROSENMUND, Pharmaceut. Acta Helv. *17*, 176 (1942).  
 [15] A. STOLL, E. ANGLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL & J. RENZ, Helv. *34*, 1460 (1951).  
 [16] C. B. BARRETT, M. S. J. DALLAS & F. B. PADLEY, Chemistry & Ind. *1962*, 1050; L. J. MORRIS, *ibid.* *1962*, 1238; B. DE VRIES & G. JURRIENS, Fette, Seifen, Anstrichmittel *65*, 725 (1963); Chem. Abstr. *60*, 3205 (1964); J. W. COPIUS-PEEREBOOM & H. W. BEEKES, J. Chromatogr. *17*, 99 (1965); weitere Lit. daselbst.  
 [17] B. DE VRIES, J. Amer. Oil chem. Soc. *40*, 184 (1963); *41*, 403 (1964); Chem. Abstr. *59*, 1853 (1963); *61*, 3316 (1964).  
 [18] V. CALCANDI, I. CALCANDI & J. LUNGEANU, Naturwiss. *50*, 498 (1963); V. CALCANDI & J. LUNGEANU, *ibid.* *51*, 242 (1964).  
 [19] H. MUHR, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, Helv. *37*, 403 (1954).  
 [20] R. REES, C. R. GAVILANES, W. MEIER, A. FÜRST & K. MEYER, Helv. *44*, 1607 (1961).  
 [21] R. TSCHESCHE, B. NIYOMPORN & H. MACHLEIDT, Chem. Ber. *92*, 2258 (1959); H. LICHTI & A. VON WARTBURG, Helv. *44*, 238 (1961).  
 [22] S. RANGASWAMI & T. REICHSTEIN, Helv. *32*, 939 (1949).  
 [23] A. STOLL & J. RENZ, Enzymologia *7*, 362 (1939).  
 [24] J. A. MOORE, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. *37*, 755 (1954).  
 [25] E. VOTOČEK & F. VALENTIN, Coll. czechoslov. chem. Commun. *2*, 36 (1930).  
 [26] M. VISCONTINI, D. HOCH & P. KARRER, Helv. *38*, 642 (1955).  
 [27] W. KLYNE, Proc. biochem. Soc., Biochem. J. *47*, XLI (1950).  
 [28] E. VON ARX & R. NEHER, Helv. *39*, 1664 (1956).

## 198. Über die 1,2-Verschiebung der Säureamidgruppe bei der Benzilsäureumlagerung von Chinisatin

von H. Dahn und A. Donzel<sup>1)</sup>

(14. VII. 67)

Wir haben vor kurzem berichtet [1], dass bei der der Benzilsäureumlagerung ähnlichen Umwandlung eines Esters und eines Amides von  $\alpha,\beta$ -Diketosäuren die Ester- bzw. Amidgruppe wandert.



<sup>1)</sup> Aus der Dissertation A. DONZEL, Lausanne 1965.