

Verfahrens wurden 34 mg Prismen vom Schmp. 316–322° (Zers.) erhalten.  $[\alpha]_D^{20}$ : + 27.5° ± 2° (Methanol).  $\lambda_{\max}$  295 m $\mu$ ,  $\alpha$  = 10.8,  $\log \epsilon$  = 3.81.

$C_{31}H_{40}O_{12}$  (604.6) Ber. C 61.56 H 6.67  $OCH_3$  5.12

Gef. C 61.85 H 7.18  $OCH_3$  5.04

Aus der Höhe der UV-Absorption würde sich ein Mol.-Gew. von 561 errechnen. Bei der Spaltung mit Säure konnte kein Zucker gefunden werden; eine anscheinend positive Keller-Kiliani-Reaktion geht auf die Färbung des Aglykons mit konz. Schwefelsäure zurück.

Als Färbungen mit konz. Schwefelsäure wurden gefunden: (0 Min.) karminrot, (1 Min.) rotviolett, (3 Min.) blauviolett, (5 Min.) blauviolett, (10 Min.) blauviolett, (15 Min.) blauviolett mit blauem Rand, (30 Min.) desgl., (1 Stde.) dunkelblau, (2 Stdn.) desgl., (3 Stdn.) desgl., (4 Stdn.) himmelblau.

Bovoerythrotoxin: 730 mg Rückstand der Zone mit dem  $R_F$ -Wert 0.56 wurden an  $Al_2O_3$  (13.5 g) in üblicher Weise chromatographiert. Die mit Chloroform + 4 und + 8% Methanol erhaltenen Fraktionen ergaben 354 mg Rückstand, die nach Umkristallisieren aus Methanol/Äther Kristalle ergaben. Sie schmolzen bei 244–252°, Ausb. 185 mg.  $[\alpha]_D^{25}$ : + 19.7° ± 3.7° (Methanol).  $\lambda_{\max}$  296 m $\mu$ ,  $\alpha$  = 11.4,  $\log \epsilon$  = 3.83.

$C_{31}H_{40}O_{11}$  (588.6) Ber. C 63.25 H 6.85  $OCH_3$  5.27

Gef. C 63.12 H 7.20  $OCH_3$  7.06, 7.31

Der beide Male zu hoch gefundene Methoxylwert ist auffällig, wir haben dafür bisher keine Erklärung. Aus der Höhe der UV-Absorption würde sich ein Mol.-Gew. von 532 errechnen. Die Mikrospektung mit Säure lieferte keinen Zucker. Auch hier geht eine anscheinend positive Keller-Kiliani-Reaktion auf das Genin zurück.

Als Färbungen mit konz. Schwefelsäure wurden gefunden: (0 Min.) karminrot, (1 Min.) rotbraun, (3 Min.) braunrosa, (5 Min.) braunrot, (10 Min.) rotbraun, (15 Min.) desgl., (1 Stde.) rotbraun mit violetter Rand, (90 Min.) rotviolett, (2 Stdn.) grau violett, (3 Stdn.) grau.

Kilimandscharotoxin<sup>2)</sup>:

$C_{31}H_{40}O_{12}$  (604.6) Ber. C 61.57 H 6.66 Gef. C 61.61 H 6.75

Aus der Höhe der UV-Absorption würde sich ein Mol.-Gew. von 550 errechnen.

## 229. Rudolf Tschesche, Sophie Wirtz und Günther Snatzke: Über pflanzliche Herzgifte, XXXII. Mitteil.<sup>1)</sup>: Über die herzwirksamen Glykoside der Wurzeln von *Evonymus atropurpurea* (Jacq.)

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 11. Juli 1955)

In den Wurzeln von *Evonymus atropurpurea* (Jacq.) konnten vier Cardenolidglykoside nachgewiesen werden. Nach Luizym-Spaltung lassen sich Digitoxigenin und ein Digitoxigenin-monodigitoxosid isolieren, Hydrolyse mit Strophanthobiase ergibt Evatromonosid, das als Digitoxigenin- $\beta$ -D-digitoxosid-(1.5) erkannt wurde.

Die Rinde der in Nordamerika heimischen *Evonymus atropurpurea* (Jacq.) (Celastraceae) wird bereits 1890 in der Pharmacopoeia der Vereinigten Staaten und 1898 in der Britischen Pharmacopoeia erwähnt. Die Droge ist noch heute in Frankreich, Griechenland und Brasilien offizinell, wo sie vorwiegend als Cholagogum und als leichtes Abführmittel verwendet wird. Pharmakologisch

<sup>1)</sup> XXXI. Mitteil.: R. Tschesche, H.-W. Sarau u. K. Sellhorn, Chem. Ber. 88, 1612 [1955].

ließ sich in ihr ein digitalisartig wirkender Inhaltsstoff feststellen<sup>2, 3, 4)</sup>, doch ist seine Reindarstellung bisher nicht erfolgt. Reichstein und Mitarbb.<sup>5)</sup> haben aus den Samen des verwandten Pfaffenhütchens, *Evonymus europaea* L., das Cardenolidglykosid Evonosid isoliert und es als ein Triglykosid des Digitoxigenins mit L-Rhamnose und 2 Moll. D-Glucose erkannt. Bei der Behandlung mit Strophanthobiasie lieferte es unter Abspaltung von Glucose Evomonosid und Evobiosid, die noch Rhamnose, bzw. Rhamnose und 1 Mol. Glucose enthielten. Als wir durch die Firma Merck & Co., Rahway, N. J., in den Besitz von 12 kg getrockneter Wurzeln von *Evonymus atropurpurea* (Jacq.) gelangten\*), versuchten wir festzustellen, ob sich hier die gleichen Glykoside wie in den Samen von *Evonymus europaea* L. finden.

Die Isolierung der Cardenolidglykoside wurde in der üblichen Weise, wie im Versuchsteil beschrieben, durchgeführt. Die Hauptmenge fand sich im Chloroform/Äthanol (2:1)-Extrakt, geringere Mengen auch in der (1:1)-Ausschüttelung, die wäßrige Phase war danach frei von Herzgiften. Papierchromatographisch mit Pentanol/Wasser<sup>6)</sup> als Lösungsmittel ließen sich in beiden wirksamen Fraktionen 4 Glykoside mit den  $R_F$ -Werten 0.16, 0.35, 0.44 und 0.56 nachweisen (Sichtbarmachung mit dem Reagens nach K e d d e).

Die weitere Reinigung des Glykosid-Gemisches, welches etwa 25% herzwirksamer Glykoside enthielt, wurde zunächst nach dem Verfahren von H. Rosenmund und T. Reichstein<sup>7)</sup> versucht, bestehend in der Acetylierung der Glykoside und Chromatographie der Acetate an Aluminiumoxyd. Eine befriedigende Auftrennung des Gemisches der Glykosid-acetate erfolgte nicht. Es wurde deshalb versucht, die wieder entacetylierten Glykoside an Papierbogen präparativ zu trennen. Dabei ließen sich auch unter Verwendung von wassergesättigtem Pentanol die Hauptkomponenten des Gemisches mit den  $R_F$ -Werten 0.35 und 0.44 in Mengen von einigen mg in ca. 80–90-proz. Reinheit fassen, sie kristallisierten jedoch nicht.

Um einen ersten Einblick in die Natur der vorliegenden Cardenolid-Derivate zu erlangen, wurde nunmehr ein partieller enzymatischer Abbau des Glykosid-Gemisches durchgeführt, da erfahrungsgemäß die Monoglykoside leichter zur Kristallisation zu bringen sind. Daß es sich um zuckerreichere Glykoside handeln mußte, zeigte schon die Schwierigkeit, mit der sie sich durch Ausschütteln mit Chloroform/Äthanol-Gemischen der wäßrigen Phase entziehen ließen. Als Fermentpräparat wurde zuerst  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus oryzae* (Luizym) gewählt<sup>8)</sup>. Danach ließen sich mit Äther zwei Verbindungen der Cardenolidgruppe extrahieren, von denen sich nach Chromatographie an Aluminiumoxyd die leichter eluierbare als Digitoxigenin erwies. Es darf angenommen werden, daß dieses Aglykon vorher an Glucose

<sup>2)</sup> H. Meyer, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **16**, 163 [1883].

<sup>3)</sup> G. Romm, „Untersuchungen über Evonymin“, Dissertat., Dorpat 1884.

<sup>4)</sup> R. Wasicky, Physiopharmakognosie, Verlag Fromme, Wien 1932.

<sup>5)</sup> A. Meyrat u. T. Reichstein, Pharmac. Acta Helvetiae **23**, 135 [1948]; F. Šantavý u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta **31**, 1655 [1948].

<sup>6)</sup> Hrn. Dr. Tishler, Merck & Co., Rahway, N. J., U.S.A., sei auch hier vielmals für die Überlassung der Droge gedankt.

<sup>7)</sup> R. Tschesche, G. Grimmer u. F. Seehofer, Chem. Ber. **86**, 1235 [1953].

<sup>8)</sup> Pharmac. Acta Helvetiae **17**, 176 [1942].

<sup>9)</sup> R. Tschesche u. F. Seehofer, Chem. Ber. **87**, 1108 [1954].

<sup>10)</sup> R. Tschesche, K. Sellhorn u. K.-H. Brathge, Chem. Ber. **84**, 576 [1951]; R. Tschesche u. K.-H. Brathge, Chem. Ber. **85**, 1042 [1952].

gebunden war, die neben Arabinose nachgewiesen werden konnte. Von der Arabinose möchten wir vermuten, daß sie vielleicht von einer ebenfalls hydrolysierten Verunreinigung ohne Herzgiftcharakter herrührt. Als zweite Komponente konnte in sehr kleiner Menge ein Glykosid des Digitoxigenins mit Digitoxose gefaßt werden (Schmp. 186–194°, nach vorherigem Schmelzen bei 133–138° und Wiederfestwerden), das zunächst Kristallisat A genannt wurde. Da uns nur ca. 5 mg reines Glykosid zur Verfügung standen, konnten Genin und Zucker nur durch Mikrospaltung<sup>10)</sup> und mit Hilfe der Papierchromatographie bestimmt werden. Alle Reaktionen und  $R_F$ -Werte deuten darauf hin, daß es sich hierbei um ein Digitoxigenin-Derivat handelt, das mit 1 Mol. Digitoxose verbunden ist.

Da sich bei der Luizym-Spaltung ein erheblicher Teil der Glykoside der Hydrolyse entzogen hatte, weil vor allem nur das Glykosid mit dem  $R_F$ -Wert 0.56 abgebaut worden war, haben wir die wäßrige Phase nach der Ätherausschüttelung einer erneuten Hydrolyse, nunmehr mit Strophanthobiasen aus *Strophanthus kombé*<sup>11)</sup>, unterzogen. Aus dem Ätherextrakt des Spaltansatzes konnte nach Chromatographie an Aluminiumoxyd ein Glykosid kristallisiert werden (Schmp. 181–186°,  $[\alpha]_D^{20}$ : –14.6°), dem wir die Bezeichnung Evatromonosid geben möchten. Erstaunlicherweise lieferte es bei der Spaltung ebenfalls Digitoxigenin und Digitoxose im Verhältnis 1:1. Beide Spaltstücke konnten kristallisiert werden. Zur Identifizierung des Zuckers wurden noch die  $R_F$ -Werte in mehreren Lösungsmittelgemischen bestimmt. Wie die folgende Tafel 1 zeigt, sind die Unterschiede der möglichen 2-Desoxy-hexamethylosen\*) groß genug, um eine Entscheidung zu ermöglichen<sup>10)</sup>.

Tafel 1.  $R_F$ -Werte möglicher Spaltzucker in verschiedenen Lösungsmittelgemischen

| $-R_F$ -Werte in        | Gemisch I | II    | III   |
|-------------------------|-----------|-------|-------|
| D-Digitoxose .....      | 0.60      | 0.665 | 0.71  |
| 2-Desoxy-L-rhamnose ... | 0.58      | 0.65  | 0.705 |
| D-Boivinose .....       | 0.61      | 0.625 | —     |
| L-Fucose .....          | 0.51      | 0.58  | —     |

Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2043a.

Gemisch I: *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3) leichte Phase. Gemisch II: Essigester/Pyridin/Wasser (2:1:2). Gemisch III: *n*-Butanol/Äthanol/Wasser (5:1:4).

Die erhaltenen  $R_F$ -Werte der Spaltzucker aus Kristallisat A und Evatromonosid stimmten allein mit den für die Digitoxose gefundenen Zahlen überein.

Die Verknüpfungsart von Genin und Zucker folgt offenbar auch hier der Klyneschen Regel<sup>12)</sup>. Da Perjodsäure sowohl Kristallisat A als auch Evatromonosid angreift, müssen beide Glykoside in pyranoider Form vorliegen. Wie

<sup>10)</sup> R. Tschesche u. G. Grimmer, Chem. Ber. 87, 418 [1954].

<sup>11)</sup> J. Schmutz u. T. Reichstein, Pharmac. Acta Helveticae 22, 359 [1947]; W. A. Jacobs u. A. Hoffmann, J. biol. Chemistry 69, 153 [1926].

\*) Hrn. Prof. Dr. Reichstein, Basel, danken wir sehr für die Überlassung der Vergleichszucker. <sup>12)</sup> W. Klyne, Biochem. J. 47, XLI [1950].

aus Tafel 2 hervorgeht, stimmen die molaren Drehungsdifferenzen  $\Delta M$  (Glykosid-Genin) beim Evatromonosid und bei dem als Corotoxigenin- $\beta$ -D-digitoxosid erkannten Boistrosid<sup>13)</sup> innerhalb der Fehlergrenzen überein, Evatromonosid ist somit Digitoxigenin- $\beta$ -D-digitoxosid-(1.5).

Tafel 2. Molare Drehungsdifferenzen  $\Delta M$  (Glykosid-Genin) bei Evatromonosid und Boistrosid

|                     | $M_D$                    | $\Delta M$                |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|
| Digitoxigenin ..... | $+65^\circ \pm 11^\circ$ | $-139^\circ \pm 21^\circ$ |
| Evatromonosid ..... | $-74^\circ \pm 10^\circ$ |                           |
| Corotoxigenin ..... | $+163^\circ \pm 8^\circ$ | $-137^\circ \pm 22^\circ$ |
| Boistrosid .....    | $+26^\circ \pm 14^\circ$ |                           |

Kristallisat A und Evatromonosid sind beide Digitoxigenin-digitoxoside, geben gleiche Färbungen mit konz. Schwefelsäure (s. Tafel 3) und Antimontrichlorid (20-proz. in Chloroform), haben im Gemisch Octanol/Pentanol/Wasser/Formamid (6:2:1:4)<sup>6)</sup> denselben  $R_F$ -Wert 0.50 und werden beide von Perjodsäure angegriffen. Dagegen unterscheiden sie sich in der Kristallform und im Schmelzpunkt; Kristallisat A liefert dünne, zu Büscheln vereinigte Nadeln (Schmp.  $133\text{--}138^\circ/186\text{--}194^\circ$ ), während Evatromonosid rosettenförmig angeordnete Prismen ergibt (Schmp.  $181\text{--}186^\circ$ ). Trotz gegenseitigen Animpfens lassen sich die beiden nicht ineinander überführen. Die IR-Spektren, wegen der geringen Substanzmenge nur in KBr-Einpressung statt in Lösung aufgenommen\*), zeigen einige geringfügige Unterschiede.

Tafel 3. Färbungen mit konz. Schwefelsäure

| Substanz             | 0         | 5         | 20        | 60 Min.   |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Digitoxigenin .....  | hellgelb  | ockergelb | graugrün  | braungrün |
| Kristallisat A ..... | olivbraun | olivbraun | braungrau | mausgrau  |
| Evatromonosid .....  | olivbraun | olivbraun | braungrau | mausgrau  |

Kristallisat A könnte daher das Anomere des Evatromonosids sein, unter Umständen handelt es sich aber auch nur um zwei verschiedene Kristallmodifikationen des Digitoxigenin- $\beta$ -D-digitoxosids. Ein ganz ähnlicher Fall wird von F. E. Bader, E. Schlittler und H. Schwarz<sup>14)</sup> beim Desacetyl-diabolin beschrieben. Die endgültige Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten läßt sich erst nach Isolierung neuen Materials treffen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

### Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Kofler-Heiztisch bestimmt und sind unkorrigiert, die Analysen führte Herr Dr. R. Kretz im mikroanalytischen Labor des Instituts für organische Chemie der Universität Graz aus.

Aufarbeitung der Droge: 12 kg getrocknete und gepulverte Wurzeln von *Evonymus atropurpurea* (Jacq.) wurden 3mal mit je 15 l Petroläther bei Zimmertemperatur extrahiert. Anschließend wurde die Droge im Perkulator mit 48 l Methanol bei  $45\text{--}50^\circ$  ausgezogen und noch mit 30 l Methanol bei Siedehitze extrahiert. Danach war der Rückstand frei von Cardenolid-Derivaten.

<sup>13)</sup> O. Schindler u. T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **35**, 730 [1952].

\*) Wir danken Hrn. Dr. E. Biekert, Max-Planck-Institut für Biochemie Tübingen, sehr für die Aufnahme dieser IR-Spektren. <sup>14)</sup> *Helv. chim. Acta* **36**, 1256 [1953].

Die vereinigten Methanolextrakte wurden i. Vak. auf 1200 ccm eingengt und der Rückstand mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt. Die erhaltene Lösung wurde noch einmal mit Petroläther und dann mit Äther ausgezogen, beide Extrakte gaben keine Reaktion nach Kedde. Es folgte eine Reinigung der verbliebenen Lösung in der üblichen Weise mit frisch gefällttem Bleihydroxyd, nach Einstellen des  $p_H$  auf 6.5 mit verd. Schwefelsäure wurde i. Vak. wieder auf 1500 ccm konzentriert. Danach wurde zunächst 6mal mit je 600 ccm Chloroform extrahiert, 3mal mit je 750 ccm Chloroform/Äthanol-Gemisch (2:1) und schließlich 3mal mit je 600 ccm Chloroform/Äthanol-Gemisch (1:1). Der Extrakt mit reinem Chloroform wog nach dem Abdampfen des Lösungsmittels 25.5 g und enthielt nur Spuren von Cardenolid-Derivaten. Der Chloroform/Äthanol-Auszug (2:1) ergab 30.9 g Rückstand und der Auszug (1:1) 18.5 g.

Bestimmung des Cardenolid-Gehaltes: Um einen Anhaltspunkt über die Mengen an Cardenolid-Derivaten in den einzelnen Fraktionen zu erhalten, wurden 1–3 mg Trockenrückstand genau eingewogen und dann in 1 ccm Methanol gelöst. Es wurden 4 ccm frisch vorbereitetes Reagens nach Kedde in der Kälte zugegeben und sofort die Extinktion bei 540 m $\mu$  im Beckman-Spektrophotometer in Abständen von je 1 Min. bestimmt. Das Maximum der Absorption ist im allgemeinen nach 3 Min. erreicht. Nach ca. 24 Stdn. ist die Violetrot-Färbung der Cardenolide verblaßt, eine dann noch verbleibende Restfärbung bei 540 m $\mu$  wurde in ihrer Extinktion vom Erstwert abgezogen. Als Vergleichssubstanz diente Digitoxin, ferner wurde gegen Kedde-Reagens kompensiert.

Es ließ sich so in der 2:1-Ausschüttelung ein Gehalt von ca. 25% an herzwirksamem Glykosid (berechnet auf Digitoxin) feststellen, in der 1:1-Fraktion von ca. 12–15%.

Spaltung mit Luizym: 6.8 g des nach mehrmaliger Chromatographie an Aluminiumoxyd (als Acetat) gereinigten Glykosid-Gemisches der Chloroform/Äthanol-Ausschüttelung (2:1) wurden in 1000 ccm Wasser gelöst und mit 7 g in wenig Wasser aufgeschlämmtem Luizym versetzt. Die Lösung, die ein  $p_H$  von 5.8 aufwies, wurde nach Zugabe von etwas Toluol gründlich durchgeschüttelt und im Brutschrank 8 Tage bei 37° stehen gelassen. Danach wurde die Lösung auf 350 ccm i. Vak. konzentriert und mit dem dreifachen Volumen Äthanol versetzt. Es wurde einige Min. zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen das ausgeflockte Fermentmaterial abfiltriert. Das Filtrat wurde nach Einengen i. Vak. auf 300 ccm 3mal mit je 200 ccm Äther ausgeschüttelt. Der Äther hinterließ nach Waschen mit wenig Wasser und Natriumcarbonat-Lösung beim Eindampfen einen Rückstand von 1.55 g. Eine anschließende Extraktion der Lösung mit 6mal je 250 ccm Chloroform lieferte nach dem Eindampfen 0.6 g. Schließlich wurde die auf 60 ccm eingengte Lösung 7mal mit je 150 ccm Chloroform/Äthanol (3:2) extrahiert, wobei 3.2 g resultierten.

Der Chloroformauszug zeigte bei der Papierchromatographie neben den beiden Cardenoliden, die sich zur Hauptmenge im Ätherextrakt fanden, eine kleine Menge des Glykosides mit dem  $R_F$ -Wert 0.16 an. Dieses und die Verbindungen mit den  $R_F$ -Werten 0.35 und 0.44 bildeten den Hauptanteil der Cardenolide im Chloroform/Äthanol-Extrakt. Die Verbindung mit dem  $R_F$ -Wert 0.56 war vollkommen verschwunden, doch dürfte auch ein gewisser Abbau des einen oder anderen der weiteren Glykoside erfolgt sein, wie sich aus der Menge der Cardenolide im Äther ergab, soweit sich dies aus der Intensität der Flecke bei der Papierchromatographie schätzen ließ. In der wäßrigen Lösung konnten Glucose und Arabinose papierchromatographisch durch Vergleiche mit authentischen Präparaten nachgewiesen werden: Glucose  $R_F$ -Wert 0.17, Arabinose 0.22 im Gemisch *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3); Glucose 0.39 und Arabinose 0.45 im Gemisch Essigester/Pyridin/Wasser (2:1:2).

Chromatographie des Ätherextraktes: 1.4 g Rückstand wurden in 12 ccm Benzol/Chloroform-Gemisch (1:2) gelöst und an einer Säule mit  $Al_2O_3$  (Teilchendurchmesser 0.085 mm) in üblicher Weise chromatographiert. Es wurden zunächst je 10 ccm Durchlauf aufgefangen, vom Gemisch Chloroform + 2% Methanol an je 100 ccm. Als Lösungsmittel wurden verwendet: Benzol/Chloroform (1:1), Chloroform, Chloroform + 1% Methanol, Chlf. + 2% Methanol, Chlf. + 5% Methanol, Chlf. + 50% Methanol und reines Methanol. Sämtliche Fraktionen wurden papierchromatographisch untersucht; Lösungsmittelgemisch: Octanol/Pentanol/Wasser/Formamid (6:2:1:4). Es erwiesen sich

die Fraktionen 21–38 als im wesentlichen einheitlich (mit Chloroform bzw. Chlf. + 1% Methanol erhalten). Sie ergaben aus Aceton unter Zusatz von Äther/Petroläther 38 mg Nadeln vom Schmp. 245–250°,  $[\alpha]_D^{20}$ : +19.2° ± 4° (Methanol).

$C_{25}H_{34}O_4$  (374.5) Ber. C 73.76 H 9.15 Gef. C 74.12 H 9.21

Diese Substanz konnte durch  $R_F$ -Wert 0.39 (im oben erwähnten Lösungsmittelgemisch), Schmp., Misch-Schmp., Drehung sowie Färbungen mit konz. Schwefelsäure und 20-proz. Antimontrichlorid-Lösung einwandfrei als Digitoxigenin erkannt werden. Durch Einwirkung von verd. Salzsäure wurden auch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anhydro-digitoxigenin daraus hergestellt und papierchromatographisch deren  $R_F$ -Werte mit denen authentischer Präparate verglichen.

Kristallisat A: Aus der Fraktion 73 (Chloroform + 5% Methanol) konnten nach längerem Stehenlassen ebenfalls Kristalle erhalten werden, Ausb. 23 mg Rohkristallisat. Nach schwieriger Reinigung wurden aus Aceton/Äther/Petroläther farblose, lange zu Büscheln vereinigte Nadeln erhalten, die bei 133–138° schmolzen, dann wieder erstarrten, um sich endgültig bei 186–194° zu verflüssigen.

$C_{29}H_{44}O_7$  (504.6) Ber. C 69.02 H 8.79 Gef. C 68.80 H 8.91

Kristallisat A gibt eine positive Keller-Kiliani-Reaktion und zeigt bei der Papierchromatographie im Gemisch Octanol/Pentanol/Wasser/Formamid (6:2:1:4) einen  $R_F$ -Wert von 0.50.

Mikrospaltung: Ca. 2 mg Glykosid wurden in 0.3 ccm Methanol gelöst und mit dem gleichen Volumen 0.1 *n* HCl versetzt. Nach 2 Min. langem Erhitzen im siedenden Wasserbad wurde abgekühlt und mit 0.3 ccm Wasser versetzt. Das Methanol wurde i. Vak. abdestilliert und die Lösung anschließend zur Spaltung evtl. gebildeten Methylglykosides 2 Min. nachhydrolysiert. Anschließend wurde das gebildete Aglykon durch viermaliges Ausschütteln mit je 0.5 bis 1 ccm Chloroform extrahiert. Die verbleibende Restlösung wurde mit etwas basischem Ionenaustauscher Amberlit IR 4 B von Säure befreit und zur Identifizierung des Zuckers verwendet.

Das gebildete Aglykon konnte wegen der geringen Menge nur papierchromatographisch als Digitoxigenin identifiziert werden sowie durch die Färbungen, die es auf dem Papier mit 20-proz. Antimontrichlorid- bzw. Trichloressigsäure-Lösung lieferte (roströte Fluoreszenz im UV-Licht). Ferner wurden mit Säure daraus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anhydro-digitoxigenin hergestellt und durch ihre  $R_F$ -Werte auf dem Papier identifiziert.

Der abgespaltene Zucker wurde durch Papierchromatographie als Digitoxose sehr wahrscheinlich gemacht.

Evatromonosid: Die 3.2 g Chloroform/Äthanol-Extrakt (3:2) aus der Luizym-Spaltung (nicht angegriffener Anteil) wurden in 250 ccm Wasser gelöst und mit 3.2 g eines Strophanthobiase-Präparates aus *Stroph. kombé*<sup>11</sup>) und etwas Toluol nach gründlichem Durchmischen 7 Tage bei 37° stengelassen. Die Aufarbeitung erfolgte in entsprechender Weise wie beim Luizym-Versuch. Der Ätherextrakt ergab 600 mg Rückstand, der in üblicher Weise an 17 g  $Al_2O_3$  (Teilchendurchmesser 0.085 mm) chromatographiert wurde. Aufgefangen wurden bis zur 35. Fraktion je 20 ccm Lösungsmittel, später 100 ccm. Die Fraktionen 30–36 mit Chloroform + 1 bzw. 2% Methanol lieferten nach dem Eindampfen aus Aceton mit etwas Äther/Petroläther oder aus Essigester/Petroläther Kristalle, die nach dem Umkristallisieren aus den gleichen Lösungsmitteln zu Rosetten vereinigte Prismen ergaben, die bei 181–186° schmolzen; Ausb. an reinem Glykosid 100 mg. Weitere Mengen dieses Glykosids konnten durch Einwirkung neuer Strophanthobiase auf den nicht angegriffenen Glykosidanteil erhalten werden.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-14.6^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0.343$ , Methanol).

$C_{29}H_{44}O_7$  (504.6) Ber. C 69.02 H 8.79 Gef. C 69.21 H 8.98

Evatromonosid gibt eine positive Keller-Kiliani-Reaktion, und im Papierchromatogramm hat es unter denselben Bedingungen, wie beim Kristallisat A beschrieben, den gleichen  $R_F$ -Wert 0.50.

Die Mikrospaltung mit 50 mg Substanz lieferte Digitoxigenin, das durch Schmp., Misch-Schmp. und durch Papierchromatographie sowie die  $R_F$ -Werte der beiden Anhydro-Derivate  $\alpha$  und  $\beta$  identifiziert wurde. Der Zucker konnte kristallisiert erhalten werden und zeigte einen Schmp. von 100–102°, Digitoxose 108°. Papierchromatographisch gab er die  $R_F$ -Werte, die für Digitoxose charakteristisch sind.