

123. Die Glykoside von *Periploca nigrescens Afzel*¹⁾

Glykoside und Aglykone, 134. Mitteilung²⁾

von E. Schenker, A. Hunger und T. Reichstein.

(23. III. 54.)

Periploca nigrescens Afzel (Asclepiadaceae) ist eine im tropischen Westafrika weitverbreitete Liane, die besonders im Oubangui-Gebiet, vielleicht auch im Kongo, zur Bereitung von Pfeilgift verwendet wird³⁾⁴⁾⁵⁾. Während die verwandte *Periploca graeca L.* recht genau untersucht ist⁶⁾, fanden wir über chemische Untersuchungen von *P. nigrescens* keine Literaturangaben. Im folgenden wird über eine solche berichtet. *P. nigrescens* erwies sich als relativ reich an digitaloiden Glykosiden. Die Trennung der erhaltenen Gemische war aber schwierig, und ausser der Isolierung einer kleinen Menge eines Stoffes (Subst. E. Sche. 17), der bei der Zuckerprüfung eine positive Reaktion gab, konnte bisher keines der vorhandenen Glykoside in Kristallen gefasst werden. Dagegen liessen sich teils direkt, teils nach fermentativem Abbau eine Reihe krist. Aglykone isolieren, wodurch gewisse Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandenen Glykoside möglich wurden. Die bisherigen Resultate haben daher mehr orientierenden Charakter, sie dürften aber für eine spätere genauere Untersuchung nützlich sein.

Beschaffung des Pflanzenmaterials.

Das für diese Untersuchung dienende Material bestand aus den oberirdischen sowie den wenig unter der Erdoberfläche kriechenden Teilen (total 16,55 kg, hauptsächlich 1–2 cm dicke Triebe, die von Blättern, Früchten und kleinen Nebenzweigen befreit wurden) von ca. 15 nahe beieinander (innerhalb eines Quadrates von ca. 300–500 m

¹⁾ Auszug aus Diss. E. Schenker, Basel, die demnächst erscheint.

²⁾ 133. Mitteilung: A. Katz, Helv. **37**, 833 (1954).

³⁾ L. Lewin, „Die Pfeilgifte“, p. 259, 283 (Leipzig 1923); P. Staner & R. Boutique, „Mériaux pour l'étude des Plantes Médicinales indigènes du Congo Belge“. Institut. Roy. Col. Belge, Mémoires, Coll. in –8°, Section des Sciences Naturelles et Médicales, Tome 5, fasc. 6, p. 162 (Bruxelles 1937).

⁴⁾ Die Herren Dr. A. Katz und Dr. P. Speiser konnten sich im Oubangui-Gebiet persönlich davon überzeugen. Sie brachten aus der Gegend von Loko (Oubangui-Chari) auch einige mit *Periploca nigrescens* vergiftete Holzpfeile mit, die zum Schiessen von Kleinwild (bes. Vögeln und Affen) dienten.

⁵⁾ Über medizinische Verwendung von *Periploca nigrescens* durch Eingeborene der Elfenbeinküste vergl. J. Kerharo & A. Bouquet, „Plantes Médicinales et Toxicques de la Côte d'Ivoire-Haute-Volta“, p. 107 (Paris 1950); sowie in Zentralafrika R. Sillans, Ann. pharm. franç. **11**, 364 (1953).

⁶⁾ A. Stoll & J. Renz, Helv. **22**, 1193 (1939).

Seitenlänge) wachsenden Pflanzen, die am 19. Februar 1950 von den Herren Dr. A. Katz und Dr. P. Speiser beim Dorf Bogona (Strasse Gemena-Karawa, Congo Oubangui) geschnitten, lose in einen Sack verpackt und sofort persönlich im Flugzeug nach Basel mitgenommen wurden, wo sie am 22. Februar 1950 in weitgehend frischem Zustand ankamen¹⁾. *Periploca nigrescens* kann leicht mit anderen Asclepiadaceen verwechselt werden. Insbesondere ist eine sichere Unterscheidung von *Omphalognathus nigritanus N. E. Br.*²⁾ nur anhand von Blüten oder Früchten möglich. Einige der Pflanzen trugen Blüten und Früchte. Eine solche Frucht und ein Zweig mit Blättern und Blüten wurde dem Herbarium der Royal Botanical Gardens Kew eingesandt. Die Herren E. W. R. H. Milne-Redhead und R. D. Meikle waren so freundlich, die Bestimmung zu kontrollieren. Sie schrieben (am 25. 4. 52), dass es sich eindeutig um *Periploca nigrescens Afzel* handelt. Wir glauben daher, dass alle zur Untersuchung gelangten Pflanzen derselben Art angehört haben, ohne eine völlige Sicherheit dafür bieten zu können³⁾.

Vorbehandlung und Extraktion des Materials. Die erhaltenen Zweige (16,55 kg) wurden sofort nach Erhalt geschält bzw. gründlich abgeschabt und gaben 12,6 kg dunkelbraune Rinde sowie 3,95 kg entrindetes Holz. Letzteres wurde in kleine Teile zerschnitten und beide Teile für sich mit 95-proz. Alkohol gedeckt in verschlossenen Flaschen bis zur Untersuchung aufbewahrt. Zur Untersuchung wurden gewogene Proben entnommen (abgepresste feste Teile plus aliquoten Teil des Alkohols). Die Extraktion und Vortrennung wurde, wo nichts anderes erwähnt, genau wie bei *Acokanthera*-Holz durchgeführt⁴⁾.

¹⁾ Nach Beobachtungen der Herren Dr. A. Katz und Dr. P. Speiser zeigt *P. nigrescens* in frischem Zustand stark bitteren Geschmack, der nach Trocknung weitgehend verloren geht. Die Eingeborenen verwenden zur Bereitung von Pfeilgift frisches Holz. Eine früher (im Mai 1947) an einem Waldrand bei Kumasi (Goldküste) von den Herren Dr. A. Katz und Dr. J. Schmutz gesammelte Pflanze wurde an Ort und Stelle getrocknet. Eine orientierende Untersuchung dieses Materials durch Herrn Dr. R. F. Raffauf (unpubliziert) gab nur Spuren von Kristallen. Damals wurden die Rohextrakte aber nicht biologisch geprüft, und es erfolgte auch keine Kontrolle durch Papierchromatographie. Es ist daher unsicher, ob der Glykosidgehalt wirklich sehr niedrig war. Ausserdem war die botanische Bestimmung nicht völlig gesichert. — Nach den oben genannten Beobachtungen besteht aber die Möglichkeit, dass der Glykosidgehalt durch das Trocknen stark leidet.

²⁾ Nach J. Kerharo & A. Bouquet (l.c.), p. 196–197, wurden *Omphalognathus nigritanus* und *Periploca nigrescens* von den Eingeborenen der Elfenbeinküste nicht unterschieden. Sie werden für dieselben Zwecke verwendet und gleich benannt; vgl. auch R. Sillans (l. c.). Über eine orientierende pharmakologische Untersuchung von *Omphalognathus nigritanus* berichten F. Mercier & L. Vignoli, C. r. Soc. biol. 130, 1285 (1939).

³⁾ Die Pflanzen machten einen sehr einheitlichen Eindruck. Obgleich *Omphalognathus nigritanus* den Herren Dr. Katz und Dr. Speiser damals nicht bekannt war, glauben sie, dass es ihnen aufgefallen wäre, wenn sie gleichzeitig mit *Periploca nigrescens* noch eine andere Asclepiadacee angetroffen hätten.

⁴⁾ P. R. O. Bally, K. Mohr & T. Reichstein, Helv. 34, 1740 (1951); 35, 45 (1952).

Untersuchung der Rinde (Vorversuch). Eine Probe (0,32 kg) des Rindenmaterials wurde abgepresst, mit Wasser zerkleinert und mit wässrigem Alkohol extrahiert. Eine Prüfung auf Alkaloide war negativ, auf digitaloide Lactone positiv. Die weitere Aufarbeitung¹⁾ gab

1,053 g (0,33%) Ätherextrakt (A) als grünes, schwach bitteres Harz;
0,168 g (0,052%) Chloroformextrakt (B) als braunen, bitteren Schaum;
1,938 g (0,60%) Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt²⁾ als braunen, bitteren Schaum.

Die ausgeschüttelte wässrige Phase war praktisch glykosidfrei (Geschmack nicht bitter, *Raymond*-Reaktion negativ) und wurde verworfen.

Alle drei Extrakte reagierten mit *Raymond*-Reagens positiv, doch konnte auch nach Chromatographie kein krist. digitaloides Lacton daraus isoliert werden. (Lediglich der Ätherextrakt gab wenig Kristalle, Smp. 130–134°, die aber bei der *Legal*-Reaktion keine Färbung gaben und nicht weiter untersucht wurden). Der Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt wurde orientierungshalber mit Strophanthobiase³⁾ behandelt. Es trat merkliche Spaltung ein, und aus den Spaltprodukten konnte eine kleine Menge krist. Strophanthidin isoliert werden.

Da das entrindete Holz stärker bitter war als die Rinde und weniger stark gefärbte Extrakte lieferte, wurden die aus der Rinde erhaltenen Präparate nicht weiter untersucht.

Untersuchung des entrindeten Holzes.

Die Extraktion und Vortrennung durch fraktioniertes Ausschütteln geschah in 3 Portionen, prinzipiell gleich wie bei der Rinde, teilweise mit geringen Abänderungen. Beim ersten Ansatz (mit 500 g Holz) wurde eine biologische Kontrolle vorgenommen. In diesem Ansatz wurden nach Reinigung mit Petroläther zunächst die Gesamtglykoside direkt mit Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Erhalten wurden 6,63 g (1,3 %) rohes Glykosidgemisch. Die biologische Prüfung⁴⁾ an der Katze (*Hatcher*-Test) ergab eine Wirksamkeit von 2,3 K. E. pro mg. 5,63 g dieses Gemisches (entspr. 425 g Holz) wurden nun durch fraktioniertes Ausschütteln aus Wasser weiter getrennt und

¹⁾ *P. R. O. Bally, K. Mohr & T. Reichstein*, Helv. **34**, 1740 (1951); **35**, 45 (1952).

²⁾ 2:1 bedeutet das Verhältnis der Volumteile des zum Ausschütteln benützten Gemisches. Dies gilt für alle später benützten Verhältniszahlen. Das Chloroform-Alkohol-(2:1)-Gemisch ist von *A. Stoll, J. Renz & W. Kreis*, Helv. **20**, 1484 (1937), zum Ausschütteln wasserlöslicher Glykoside empfohlen worden.

³⁾ Vgl. *W. A. Jacobs & A. Hoffmann*, J. Biol. Chem. **69**, 153 (1926), sowie *A. Stoll & J. Renz*, Enzymologia **7**, 362 (1939). Hier wurde ein aus den Samen von *Strophanthus* kombé nach *J. Schmutz & T. Reichstein*, Pharm. acta Helv. **22**, 359 (1947) bereitetes Präparat verwendet.

⁴⁾ Diese und die folgenden Prüfungen wurden, wo nichts anderes erwähnt, in den Laboratorien der *CIBA-Aktiengesellschaft*, Basel, ausgeführt, wofür auch hier bestens gedankt sei.

gaben die in Tabelle 1 genannten Präparate mit den angegebenen Wirksamkeiten.

Tabelle 1.

Erhaltene Extrakte	Ausbeuten Menge in g und %	Biologische Prüfung	
		Am isolierten Froschherz ¹⁾	An der Katze ²⁾
		Systolischer Stillstand bei	Hatcher-Test K. E. pro mg
Ätherextrakt (D)	1,47 = 0,35%	1— $2 \cdot 10^{-5}$	0,52
Chloroformextrakt (E)	1,24 = 0,28%	$5 \cdot 10^{-6}$	2,8
Chloroform-Alkohol-(2:1)- Extrakt (G)	2,91 = 0,68%	$5 \cdot 10^{-6}$	4,25

Dieser Versuch zeigt, dass der Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt (G), der die stark wasserlöslichen Glykoside enthielt, nicht nur mengenmäßig am grössten, sondern auch biologisch am stärksten wirksam war. Die zwei weiteren Ansätze wurden ähnlich extrahiert und getrennt. Insgesamt wurden die in Tab. 2 genannten Ausbeuten erhalten.

Tabelle 2.

Bezeichnung der erhaltenen Extrakte	Ausbeuten in g und in %			
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Total
Verwendete Menge Holz	0,500 kg	1,680 kg	1,770 kg	3,950 kg
Petrolätherextrakt (verworfen)	1,13 = 0,23%	1,63 = 0,10%	1,74 = 0,10%	4,50 = 0,11%
Ätherextrakt (D)	1,73 ³⁾ = 0,35%	3,24 = 0,19%	5,20 = 0,30%	10,27 = 0,26%
Chloroformextrakt (E)	1,42 ³⁾ = 0,28%	7,195 = 0,43%	8,86 = 0,50%	17,48 = 0,44%
Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt (G)	3,42 ³⁾ = 0,68%	18,60 = 1,11%	24,20 = 1,37%	46,22 = 1,17%

Untersuchung des Ätherextrakts (D). Im Papierchromatogramm (vgl. Nr. 1 in Fig. 1a und 1b) wurde nur ein Fleck erhalten, der Strophanthidin entsprach. Bei der präparativen Trennung gaben die 3,24 g Extrakt (D) (aus 1,68 kg Holz, Ansatz 2) zunächst 0,12 g Nadeln vom Smp. 282—286°, die weder mit 84-proz. H₂SO₄ noch bei der Legal-Probe eine Färbung gaben (nicht untersucht). Die Mutterlaugen gaben teils durch direkte Kristallisation, teils nach Chromatographie insgesamt 0,731 g rohes Strophanthidin. Andere Kristalle wurden nicht erhalten. Auf die ganzen 3,95 kg Holz berechnet, entspricht dies 1,7 g Strophanthidin.

¹⁾ Die Konzentrationen resp. Verdünnungen sind in g pro cm³ angegeben, 10⁻⁵ bedeutet also 0,01 mg pro cm³. Ouabain zeigte unter gleichen Bedingungen systolischen Herzstillstand bei einer Verdünnung von 5 · 10⁻⁶.

²⁾ Ouabain enthält 5,6 K. E. pro mg.

³⁾ Aus obigen Zahlen umgerechnet auf 500 g Holz.

Untersuchung des Chloroformextrakts (E). Im Papierchromatogramm (vgl. Nr. 2 in Fig. 1a, 1b und 1c) konnten bei Anwendung von drei verschiedenen Systemen insgesamt 6 Flecke erhalten werden. Drei davon zeigten Laufstrecken, die denjenigen von Strophanthidin, Strophanthidol und Substanz E. Sche. 12 (siehe unten) entsprechen. Die drei weiteren konnten nicht identifiziert werden. Bei der präparativen Trennung wurden die 8,86 g Extrakt E aus Ansatz 3 (1,77 kg Holz) an Al_2O_3 chromatographiert, worauf sich die folgenden vier Kristallisate isolieren liessen: 37 mg Subst. E. Sche. 12, 39 mg Subst. E. Sche. 16, 2,03 g Strophanthidin und 58 mg Strophanthidol. Nachdem es sich gezeigt hatte, dass die Substanzen E. Sche. 12 und E. Sche. 16 bei der Acetylierung mit Pyridin-Acetanhydrid nicht verändert werden, wurden die Mutterlaugen und benachbarte amorphe Fraktionen vereinigt und acetyliert, worauf sich nochmals 594 mg rohe, bzw. 203 mg analysenreine Substanz E. Sche. 12 isolieren liessen. 8,305 g Extrakt E (1,07 g aus Ansatz 1 und 3,24 g aus Ansatz 2, zusammen aus 2,14 kg Holz) wurden ähnlich getrennt, wobei auch Reagens T von *Girard & Sandulesco*¹⁾ verwendet wurde. Ausser Subst. E. Sche. 16 wurden dieselben Stoffe isoliert.

Nimmt man die Ausbeuten bei Ansatz 3 als Grundlage, so ergeben sich auf die ganzen 3,95 kg umgerechnet die folgenden Ausbeuten:

0,535 g (0,135%) Substanz E. Sche. 12;
 0,087 g (0,022%) Substanz E. Sche. 16;
 4,53 g (1,15%) Strophanthidin;
 0,130 g (0,033%) Strophanthidol.

Unter Berücksichtigung der 1,7 g Strophanthidin aus Ätherextrakt D ergibt sich eine totale Ausbeute an Strophanthidin von 5,23 g (1,32%).

Untersuchung des Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakts (G). Da aus diesem Extrakt direkt keine Kristalle erhalten werden konnten, und da sich der entsprechende Extrakt aus Rinde mit Strophanthobiase relativ weitgehend spalten liess, wurden hier zunächst orientierende Versuche mit einigen Fermenten durchgeführt, von denen bekannt ist, dass sie verschiedene digitaloide Polyglykoside zu spalten vermögen. Zur ungefähren Kontrolle der eingetretenen Spaltung wurde aus wässriger Lösung fraktioniert mit zwei bis vier verschiedenen Lösungsmitteln resp. Gemischen (Äther, Chloroform und Chloroform-Alkohol-Gemischen) ausgeschüttelt. Da der verwendete Extrakt G praktisch frei von Substanzen war, die sich mit Äther oder Chloroform ausschütteln lassen, gibt die Menge der Äther- und Chloroformextrakte ein ungefähres Mass über die eingetretene Spaltung.

¹⁾ *A. Girard & G. Sandulesco*, Helv. **19**, 1095 (1936), sowie *O. Schindler & T. Reichstein*, Helv. **34**, 521 (1951).

Beispiele für die Kontrolle durch Papierchromatographie.

Als stationäre Phase diente entweder entsäuertes Formamid¹⁾ oder Wasser²⁾.

Die bei Fig. 3b durch senkrechte Striche getrennten Nummern sind nicht auf demselben Blatt gelaufen, so dass die Laufstrecken nicht genau vergleichbar sind. But. = n-Butanol; Bz. = Benzol; Chf. = Chloroform; Tol. = Toluol. (5:7) usw. bedeutet das Verhältnis der Volumina.

Fig. 1a—1c zeigen das Ergebnis bei Ätherextrakt D, Chloroformextrakt E und Chloroformextrakt GES. Fig. 2 zeigt das Verhalten der Substanzen E. Sche. 12 und E. Sche. 16 im Vergleich zu Acetyl-strophanthidin.

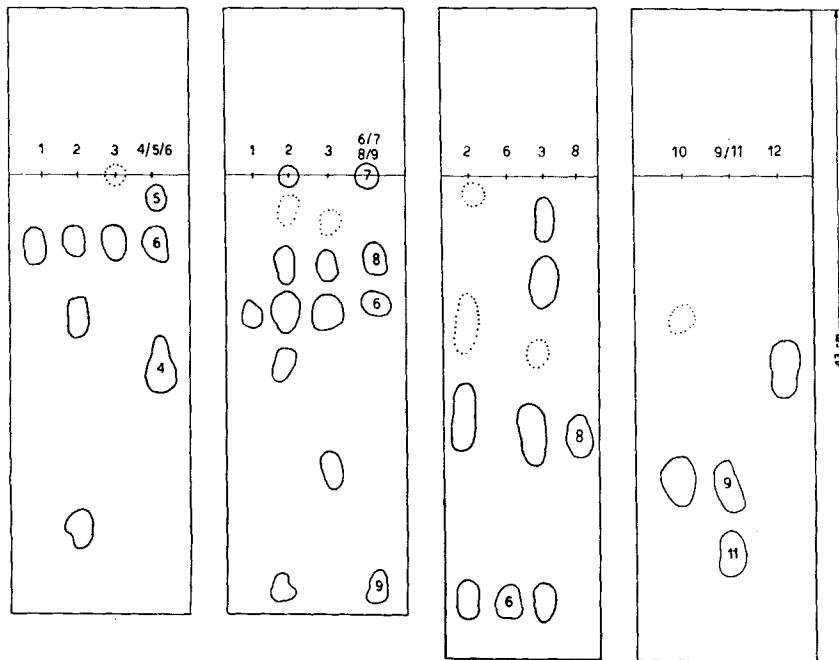


Fig. 1a.

Formamid: Chf.-Bz. (5:7)
20 Std. $t = 16^\circ$

Fig. 1b.

Formamid: Chloroform
4½ Std. $t = 14^\circ$

Fig. 1c.

Wasser: But.-Tol. (1:1)
7 Std. $t = 14^\circ$

Fig. 2.

Formamid: Chf.-Bz. (5:7)
17 Std. $t = 14^\circ$

1: 0,2 mg Ätherextrakt D aus *Periploca nigrescens*
 2: 0,2 mg Chloroformextrakt E aus *Periploca nigrescens*
 3: 0,2 mg Chloroformextrakt GES aus *Periploca nigrescens*
 4/5/6: Gemisch von je 0,03 mg Periplogenin (4), Emeyamarin (5) und Strophanthidin (6)
 7/8/9: Gemisch von je 0,03 mg Strophanthidin (6), Convallatoxin (7), Strophanthidol (8) und Subst. E. Sche. 12 (9)
 6: 0,03 mg Strophanthidin
 8: 0,03 mg Strophanthidol
 10: 0,05 mg Subst. E. Sche. 12 Rohkristallisat
 9/11: Gemisch von je 0,03 mg reiner Subst. E. Sche. 12 (9) und Subst. E. Sche. 16 (11)
 12: 0,03 mg Strophanthidinacetat.

¹⁾ Ausführung nach O. Schindler & T. Reichstein, Helv. **34**, 108 (1951), jedoch mit der von H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. **36**, 364 (1953), angegebenen Abänderung zum Imprägnieren der Papierstreifen.

²⁾ Ausführung nach E. Schenker, A. Hunger & T. Reichstein, Helv. **37**, 680 (1954).

Fig. 3a zeigt das Ergebnis an vier aufeinanderfolgenden Fraktionen, die bei der Chromatographie des Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakts GFSH an Al_2O_3 erhalten wurden. Alle diese vier Fraktionen enthalten vier verschiedene Stoffe. Sie wurden vereinigt und als Konzentrat W bezeichnet.

Fig. 3b zeigt das Ergebnis der Verteilungschromatographie von Konzentrat W, wobei sich die vier Komponenten trennen liessen. Keine derselben kristallisierte bisher.

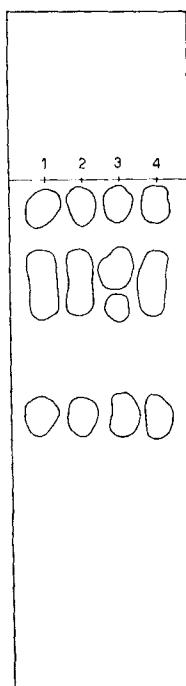


Fig. 3a.

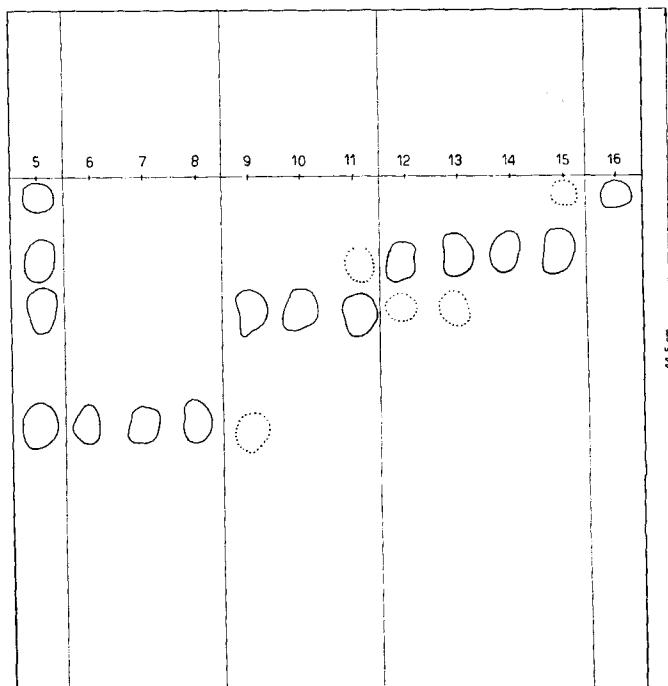


Fig. 3b.

Wasser : Butanol-Toluol (1:1) $23\frac{1}{2}$ Std. $t = 15^\circ$

1:	0,3 mg	Mutterlauge der Fraktion 23 aus Chromatographie des Chf.-Alk.- (9:1)-Extrakts GFSH aus <i>Periploca nigrescens</i>
2:	0,3 „	Fraktion 24 aus obiger Chromatographie
3:	0,3 „	25 „ „ „
4:	0,3 „	26 „ „ „
5:	0,3 „	durch milde saure Hydrolyse gereinigtes Konzentrat W
6:	0,2 „	Fraktion 1 der Verteilungschromatographie von Konz. W
7:	0,2 „	9 „ „ „ „ „
8:	0,2 „	20 „ „ „ „ „
9:	0,2 „	27 „ „ „ „ „
10:	0,2 „	32 „ „ „ „ „
11:	0,2 „	38 „ „ „ „ „
12:	0,2 „	40 „ „ „ „ „
13:	0,2 „	50 „ „ „ „ „
14:	0,2 „	54 „ „ „ „ „
15:	0,2 „	63 „ „ „ „ „
16:	0,2 „	67 „ „ „ „ „

Die Fig. 4 und 5 zeigen einige Resultate der Untersuchung von Konzentrat W und Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt.

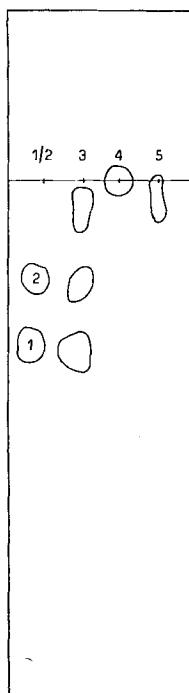


Fig. 4.
Formamid : Chloroform
9 Std. $t = 11^\circ$

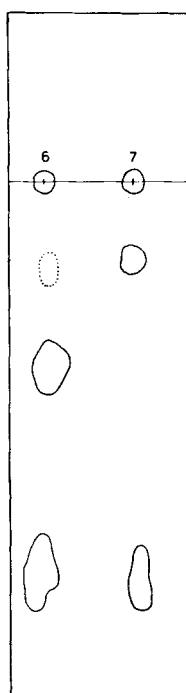


Fig. 5.
Formamid : Chf.-Bz. (7:5)
3 Std. $t = 14^\circ$

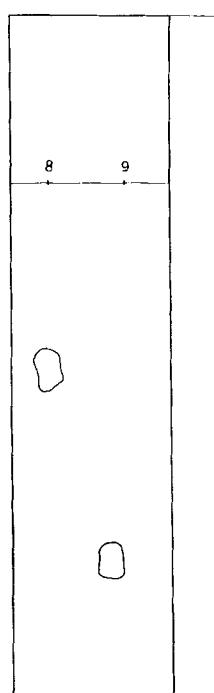


Fig. 6.
Formamid : Chf.-Bz. (7:5)
5 Std. $t = 15^\circ$

1/2: Gemisch von je 0,03 mg Strophanthidin (1) und Strophanthidol (2)
 3: 0,1 mg Chloroformextrakt nach Spaltung von Konzentrat W mit Takadiastase
 4: 0,1 mg Konzentrat W unbehandelt
 5: 0,1 mg Chloroformextrakt nach milder saurer Hydrolyse von Konzentrat W
 6: 0,3 mg acetylierter Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt GGSH
 7: 0,3 mg der vereinigten acetylierten Fraktionen Nr. 6 und 7 aus dem Chromatogramm des Chf.-Alk.-(2:1)-Extrakts GGSH
 8: 0,06 mg krist. Neutralstoff, erhalten aus Nigescigenin-diacetat mit CrO_3 ,
 9: 0,06 mg Nigescigenin-diacetat.

Beim Versuch mit Strophanthobiase wurde auch die biologische Wirksamkeit der vier erhaltenen Extrakte bestimmt. Über das Resultat orientiert Tab. 3, Seite 1012.

Die einzelnen, nach fermentativem Abbau erhaltenen Extrakte wurden auch papierchromatographisch geprüft. In allen Äther- und Chloroformextrakten (GDS und GES) konnte dabei Strophanthidin nachgewiesen werden. Dieses Aglykon wurde in einzelnen Versuchen auch präparativ isoliert. Gelegentlich wurde in den Chloroformextrakten (GES) auch ein zweiter Fleck beobachtet, der Strophanthidol

entsprach, und auch dieses Aglykon konnte (im Hauptversuch) in kleinen Mengen präparativ erhalten werden. Bei den Versuchen mit Luizym und Strophanthobiase wurden mit den Chloroformextrakten ausser den für Strophanthidin und Strophanthidol charakteristischen Flecken noch zwei bis drei weitere erhalten, die nicht identifiziert wurden. Mit den Chloroform-Alkohol-(9:1)- (GFS) und (2:1)-Extrakten (GGS) wurden stets hauptsächlich sehr lange (ca. 6—9 cm lange) Flecke erhalten, die auf nicht aufgelöste Gemische deuten.

Tabelle 3.

Abbau des Chf.-Alk.-(2:1)-Extrakts mit 4 Fermenten

	Schnek- ken- ferment ¹⁾	Adenium multiflo- rum ²⁾	Luizym ³⁾	Strophanthobiase ⁴⁾		
	Ausbeuten an Rohextrakten in % der eingesetzten Menge von Chf.-Alk.-(2:1)- Extrakt			Be- zeich- nung	Biol. Wirk- samkeit (Katze) Hatcher-Test in K. E./mg	
Ätherextrakt . . .				6,3	27,4	0,24
Chloroformextrakt . . .	19,1	7,8	25,0	21,1	GES	ca. 2,0
Chf.-Alk.-(9:1)-Extr. . .	8,4	73,2	85,4	33,1	GFS	2,5
„ „ -(2:1)- „	64,8		65,5	36,5	GGS	2,24

Da Strophanthobiase eine relativ weitgehende Spaltung bewirkte, wurde eine grössere Menge (37 g) Extrakt G (entspr. ca. 3,16 kg Holz) der Einwirkung von Strophanthobiase unterworfen. Diejenigen Anteile, die sich nachher mit Chloroform-Alkohol (9:1) aus Wasser nicht ausschütteln liessen, wurden einer nochmaligen Behandlung mit dem regenerierten Enzym unterworfen und diese Behandlung noch zweimal wiederholt. Erhalten wurden dabei insgesamt⁵⁾:

¹⁾ Bereitet nach *H. Huber, F. Blindenbacher, K. Mohr, P. Speiser & T. Reichstein*, *Helv.* **34**, 68 (1951); vergl. auch *P. Karrer, B. Joos & M. Staub*, *Helv.* **6**, 800 (1923).

²⁾ Vergl. *A. Hunger & T. Reichstein*, *Helv.* **33**, 1998 (1950).

³⁾ Es handelt sich um ein Präparat aus *Aspergillus oryzae*, das der bekannten Takadiastase nicht ganz entspricht⁶⁾, und das besonders von *R. Tschesche, K. Sellhorn & K. H. Brathge*, *B.* **84**, 576 (1951), zur Spaltung von Uzarin und verwandten Glykosiden empfohlen wurde. Wir danken dem *Luitpold-Werk*, München, auch hier bestens für die Überlassung dieses Präparats.

⁴⁾ Bereitet aus den Samen von *Strophanthus kombé*, nach *J. Schmutz & T. Reichstein*, *Pharm. acta Helv.* **22**, 359 (1947).

⁵⁾ Da im Vorversuch nur wenig Ätherextrakt resultierte, wurde hier auf ein Ausschütteln mit Äther verzichtet.

⁶⁾ *E. Bamann & K. Myrbäck*, Die Methoden der Fermentforschung, p. 1906, 2866 (Leipzig 1941). Während das Handelspräparat Takadiastase aus *Aspergillus oryzae* vor Erreichen des Mycelstadiums gewonnen wird, züchtet man die Pilze zur Fabrikation des Luizyms bis zur Sporenbildung.

7,99 g (21,5%) Chloroformextrakte,
 davon 4,87 g GESH aus Hauptansatz,
 1,60 g GESHN1 „ erster Nachspaltung,
 1,35 g GESHN2 „ zweiter „ „ „,
 0,17 g GESHN3 „ dritter „ „ „,
 19,04 g (51,5%) Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt,
 davon 15,99 g GFSH aus Hauptansatz,
 2,05 g GFSHN1 „ erster Nachspaltung,
 0,75 g GFSHN2 „ zweiter „ „ „,
 0,25 g GFSHN3 „ dritter „ „ „,
 8 g (16,7%) Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt (GGSH).

Aus der verbliebenen Wasserphase konnten nach Einengen und Zusatz von Na_2SO_4 mit Chloroform-Alkohol (2:1) noch 2,35 g Material ausgeschüttelt werden, die aber keine *Legal*-Reaktion mehr gaben und verworfen wurden.

Aus dem Ätherextrakt (GDS) sowie den Chloroformextrakten GES und GESHN2 liess sich durch direkte Kristallisation Strophanthidin gewinnen. Der Chloroformextrakt GESHN3 gab in gleicher Weise krist. Strophanthidol. Die übrigen Chloroformextrakte wurden präparativ nicht untersucht. Nach Papierchromatographie (vgl. Nr. 3 in Fig. 1a, 1b und 1c) war zur Hauptsache Strophanthidin, daneben aber Strophanthidol nachweisbar, außerdem wurden 3-4 schwächer, nicht identifizierte Flecke beobachtet.

Am genauesten wurden die stark wirksamen Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakte (GFS, GFSH und GFSHN 1-3) untersucht, von denen dafür noch total 19,89 g (entspr. ca. 3,3 kg Holz) zur Verfügung standen. Sie wurden zunächst an Al_2O_3 chromatographiert, wobei sich die drei folgenden Kristallisate und ein amorphes Konzentrat (W) erhalten liessen: 711 mg eines wahrscheinlich neuen Stoffes, den wir Nigrescigenin nennen, 48 mg eines weiteren wahrscheinlich neuen Stoffes, den wir vorläufig als Substanz E. Sche. 17 bezeichnen und 554 mg eines dritten Kristallisates, das ein Gemisch darstellte und bisher nicht vollständig getrennt werden konnte. Das amorphe, chromatographisch gereinigte Konzentrat W gab bei der Prüfung an der Katze die hohe Wirksamkeit von 4,86 K.E./mg. Im UV. zeigte dieses Material das in Kurve W (vgl. Fig. 8) angegebene Absorptionsspektrum (berechnet auf ein geschätztes Mol-Gewicht von 566,6). Aus diesem geht hervor, dass dieses Konzentrat im wesentlichen aus digitaloiden Glykosiden bestanden haben dürfte. Der Zuckernachweis sowie die *Raymond*-Reaktion waren stark positiv, die *Keller-Kilian*-Reaktion auf 2-Desoxyzucker dagegen negativ. Im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 3a) liessen sich drei bis vier verschiedene Flecke erhalten. Versuche, durch nochmalige Chromatographie an Al_2O_3 Kristalle zu gewinnen, scheiterten. Ebenso konnten weder nach Acetylierung noch nach Benzoylierung und anschliessende Chromatographie solche erhalten werden. Schliesslich wurde das amorphe Acetat-

gemisch auch noch mit POCl_3 und Pyridin behandelt¹⁾ und anschliessend chromatographiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen zeigten mit Tetranitromethan deutliche Gelbfärbung, gaben aber auch nach Impfen mit Anhydro-strophanthidin- β -D-glucosid-tetracetat²⁾ keine Kristalle. Auch milde saure Hydrolyse des Konzentrats W gab keine Kristalle und nur geringen Materialverlust (eine gewisse Reinigung scheint dabei eingetreten zu sein, vgl. Papierchromatogramm Nr. 4 und Nr. 5 in Fig. 4).

Eine relativ gute Auftrennung des Konzentrats W liess sich durch Verteilungschromatographie³⁾ erzielen. An den in Fig. 7 mit I, II, III und IV bezeichneten Spitzen waren die vier im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 3 b) nachweisbaren Glykoside angereichert und lagen teilweise rein vor. Kristalle wurden bisher aber auch aus diesen Fraktionen nicht erhalten⁴⁾.

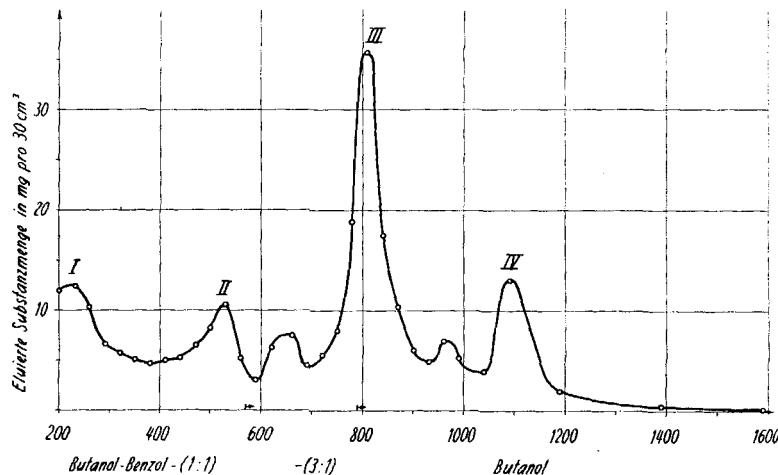


Fig. 7.

An den mit I, II, III und IV bezeichneten Stellen sind die 4 *Raymond*-positiven Substanzen angereichert.

Einen weiteren nützlichen Einblick in die Zusammensetzung von Konzentrat W gab ein Versuch zum fermentativen Abbau. Eine

¹⁾ Dieser Versuch wurde unternommen, als vermutet wurde, dass Konzentrat W als massgebenden Bestandteil Strophanthidin- β -D-glucosid enthielt, da wir als Vergleichssubstanz und zum Impfen nur über das Anhydro-acetat²⁾ verfügten. Er besitzt jedoch keine Beweiskraft, denn eine Probe krist. Convallatoxin-triacetat gab nach analoger Behandlung zwar Fraktionen, die sich mit Tetranitromethan gelb färbten, jedoch bisher auch nicht kristallisierten.

²⁾ K. Reyle, K. Meyer & T. Reichstein, Helv. **33**, 1541 (1950).

³⁾ Verteilungschromatographie von herzaktiven Glykosiden mit ähnlichen Systemen wurde zuerst von A. Stoll, E. Angliker, F. Barfuss, W. Kusmaul & J. Renz, Helv. **34**, 1460 (1951), beschrieben. Hier wurde verfahren wie bei H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. **36**, 357 (1953), beschrieben.

⁴⁾ Möglicherweise war die eingesetzte Materialmenge zu gering.

Probe (269 mg) des durch milde saure Hydrolyse vorgereinigten Konzentrats wurde mit Takadiastase¹⁾ behandelt, worauf sich 113 mg Material mit Chloroform ausschütteln liessen, während 96 mg erst mit Chloroform-Alkohol (2:1) extrahierbar waren. In den chloroformlöslichen Anteilen waren im Papierchromatogramm (Nr. 3 in Fig. 4) Strophanthidin, Strophanthidol sowie ein dritter, nicht identifizierbarer Stoff mit *Raymond*-Reagens nachweisbar. Die Chromatographie dieses Materials gab 23 mg (12 % der Theorie auf Strophanthidin- β -D-glucosid berechnet) krist. Strophanthidin. Die Mutterlauge und die wichtigsten Nebenfraktionen (zusammen 84,4 mg) wurden mit Reagens T von *Girard & Sandulesco* getrennt, wobei 16,2 mg aldehydfreie Anteile und 31,4 mg „Aldehyde“ resultierten, die aber beide nicht kristallisierten. Die bisherigen Resultate, insbesondere der fermentative Abbau mit Takadiastase lassen vermuten, dass Konzentrat W als einen massgebenden Bestandteil Strophanthidin- β -D-glucosid²⁾³⁾ enthielt, denn Takadiastase vermag, soweit bekannt, nur D-Glucose aus digitaloiden Glykosiden abzuspalten⁴⁾⁵⁾⁶⁾. Nach den von *Klyne*⁷⁾ aufgefundenen Regeln kommen D-Glykoside in der Natur fast stets in der β -Form vor. Strophanthidin- β -D-glucosid und sein Tetracetat sind von *Uhle & Elderfield*²⁾ teilsynthetisch hergestellt und beide in Kristallen erhalten worden. Bei der Nacharbeitung dieser Versuche gelang es *Reyle, Meyer & Reichstein*⁸⁾ leider nicht, diese Kristalle wieder zu erhalten, so dass kein Vergleichs- und Impfmaterial zur Verfügung stand⁹⁾.

Schliesslich wurden auch noch die nach fermentativer Spaltung erhaltenen Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakte GGS und GGSH orientierend geprüft. Eine Probe (1,17 g) des Extraktes GGS wurde zunächst an Mg-Silikat chromatographisch in 20 Fraktionen zerlegt, wobei sich nur spärliche Kristallmengen erhalten liessen; doch trat eine deutliche Materialanhäufung in frühen Fraktionen (4–7) ein. Eine Probe dieser Konzentrate wurde acetyliert, worauf im Papierchromatogramm (Nr. 7 in Fig. 5) mindestens 3 *Raymond*-positive Sub-

¹⁾ Zur Verwendung gelangte ein von der *Schweizerischen Ferment AG.*, Basel, freundlichst zur Verfügung gestelltes Präparat, wofür auch hier bestens gedankt sei.

²⁾ *F. C. Uhle & R. C. Elderfield*, J. Organ. Chem. **8**, 162 (1943).

³⁾ Obgleich wir diesen Stoff nie rein in Händen hatten, lässt sich leicht abschätzen, dass er sich aus Wasser nicht mit Chloroform ausschütteln lässt, wohl aber mit Chloroform-Alkohol-(9:1)- und -(2:1)-Gemischen.

⁴⁾ *R. Tschesche, K. Sellhorn & K. H. Brathge*, B. **84**, 576 (1951).

⁵⁾ *A. Stoll, J. Renz & A. Brack*, Helv. **34**, 397 (1951), konnten Scillirosid mit dem aus dem Mycel von *Aspergillus oryzae* gewonnenen Fermentgemisch spalten.

⁶⁾ *H. Huber, F. Blindenbacher, K. Mohr, P. Speiser & T. Reichstein*, Helv. **34**, 68 (1951), Vergl. auch *J. C. Hess, A. Hunger & T. Reichstein*, Helv. **25**, 2202 (1952).

⁷⁾ *W. Klyne*, Proc. Biochem. Soc. 288th Meet., Biochem. J. **47**, xli (1950).

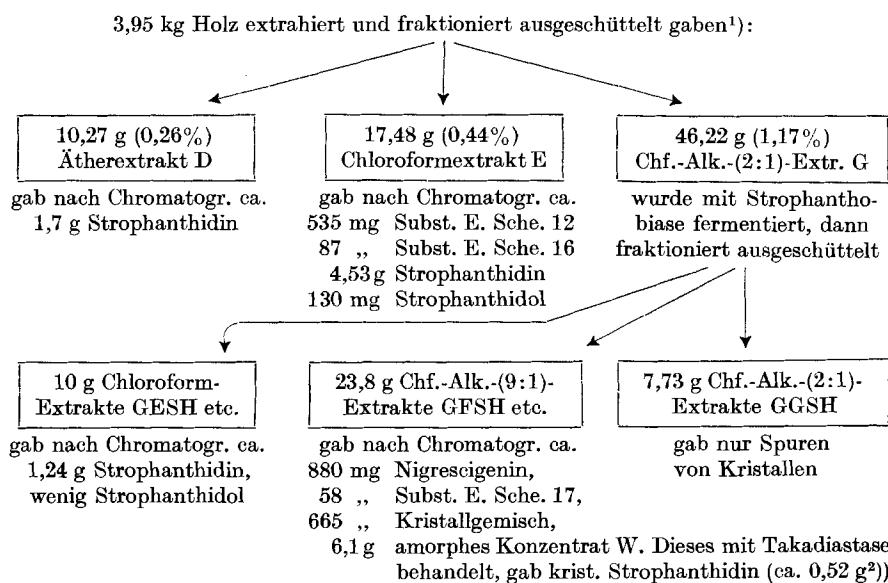
⁸⁾ *K. Reyle, K. Meyer & T. Reichstein*, Helv. **33**, 1541 (1950).

⁹⁾ Leider besass auch Herr Prof. *R. C. Elderfield* keine Proben dieser zwei Stoffe mehr.

stanzen nachgewiesen werden konnten. Die präparative Chromatographie dieses Acetatgemisches an Al_2O_3 gab aber nur spärliche Mengen von Kristallen. Eine Probe Extrakt GGSH wurde durch milde Hydrolyse vorgereinigt und anschliessend acetyliert. Im Papierchromatogramm (Nr. 6 in Fig. 5) waren mit *Raymond*-Reagens vier Stoffe nachweisbar. Eine weitere Probe Extrakt GGSH wurde mit Takadiastase behandelt, wobei jedoch nur Spuren chloroformlöslicher Substanzen erhalten wurden.

In Tab. 4 ist der Gang der wichtigsten präparativen Trennungen schematisch zusammengestellt.

Tabelle 4.
Schema der präparativen Trennungen.



Charakterisierung der isolierten Stoffe.

Strophanthidin und Strophanthidol wurden durch Smp., Drehung, Analyse, Mischprobe, Farbreaktionen und Überführung in die krist. Acetate charakterisiert.

Nigrescigenin. Dieser erst nach fermentativem Abbau erhaltene Stoff zeigte Smp. 238–241°, bzw. als Hydrat Doppel-Smp. 162–168°/243–246° und $[\alpha]_D^{15} = +24,8^\circ \pm 3^\circ$ (in Methanol). Die Analysen passten auf die Formel $C_{23}H_{32}O_7$. Der Stoff war methoxylfrei

¹⁾ Die Isolierung der Einzelbestandteile wurde jeweils nur mit einem Teil der Extrakte durchgeführt. Die im Schema angegebenen Ausbeuten sind auf die ganze Menge umgerechnet.

²⁾ Auf die ganzen 6,1 g Konzentrat W umgerechnet.

und zuckerfrei. Bei der Hydrierung in Eisessig wurden zwei Mol Wasserstoff verbraucht. Das UV.-Absorptionsspektrum (vgl. Kurve XI in Fig. 8) zeigte neben dem hohen Maximum bei $217 \text{ m}\mu$ noch ein zweites bei ca. $295 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 1,95$), das auf eine Carbonylgruppe deutet. Herr Dr. *Chen* war so freundlich, Nigrescigenin an der Katze zu prüfen¹⁾. Er fand als geometrisches Mittel der letalen Dosis bei intravenöser Infusion an 15 Tieren den Wert von $0,2293 \pm 0,02315 \text{ mg/kg}$. Es handelt sich somit um ein relativ stark herzwirksames Aglykon. Nigrescigenin gab ein krist. Acetat, dessen Analyse am besten auf die Formel eines Diacetats $C_{27}H_{36}O_9$ passte. Auch das Benzoat kristallisierte, die Analyse passte auf die Formel $C_{37}H_{40}O_9$ eines Dibenzoats. Das Acetat lieferte mit CrO_3 etwa 40 % neutrale Anteile, die teilweise kristallisierten, aber vom Ausgangsmaterial verschieden waren und etwa 60 % amorphe Säure, deren Methylester bisher auch nicht kristallisierte. Beim Kochen von Nigrescigenin mit Hydroxylamin-acetat trat Umsetzung ein, doch gelang es nicht, ein krist. Oxim zu erhalten.

Substanz E. Sche. 12. Dieser Stoff zeigte Smp. $232-234^\circ$ oder als Hydrat Doppel-Smp. $190^\circ/230-234^\circ$; $[\alpha]_D^{15} = +29,8^\circ \pm 3^\circ$ (in Chloroform). Die Analysen passten am besten auf die Formel $C_{25}H_{34}O_8$; auch die Höhe des stärksten Maximums bei ca. $216 \text{ m}\mu$ im UV.-Absorptionsspektrum (vgl. Kurve XII in Fig. 8) wäre mit dieser Formel gut vereinbar. Lediglich das Resultat der Acetylbestimmung (gef. 22,27 % $\text{CH}_3\text{CO}-$) passt nicht dazu, doch geben Acetylbestimmungen nicht immer brauchbare Werte. Möglicherweise ist in der Molekel auch eine Gruppierung enthalten, die unter den Bedingungen der Acetylbestimmung andere flüchtige Säuren (CO_2 , HCOOH) liefert. Im UV.-Spektrum ist neben dem normalen Maximum bei $216 \text{ m}\mu$ noch eine Inflection bei ca. $275 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = \text{ca. } 2,08$) sowie ein Maximum bei ca. $325 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 1,9$) sichtbar. Die Substanz war zuckerfrei und gab mit Tetranitromethan keine Gelbfärbung. Bemerkenswerterweise wurde sie beim Acetylierungsversuch mit Pyridin-Acetanhydrid bei 20° nicht verändert, enthielt somit keine leicht acetylierbare freie HO-Gruppe. Wir glauben daher, dass es sich um ein Acetat handelt. Mit CrO_3 gab die Substanz ein Gemisch von ca. 40 % neutralen und ca. 60 % sauren Anteilen. Letztere kristallisierten weitgehend. Die krist. Säure (Smp. 214°) gab mit Diazomethan einen krist. Methylester (Smp. 245° ; $[\alpha]_D^{15} = +46,8^\circ \pm 3^\circ$ (in Chloroform)), dessen Analyse auf die Formel $C_{26}H_{36}O_9$ passte. Dieses Verhalten würde dafür sprechen, dass Subst. E. Sche. 12 eine Aldehydgruppe enthält. Im UV.-Spektrum von Subst. E. Sche. 12 ist aber in der Gegend von $308 \text{ m}\mu$ kein Maximum sichtbar. Immerhin wäre es möglich, dass es durch die

¹⁾ Wir danken Herrn Dr. K. K. *Chen*, Indianapolis, auch hier für die Überlassung seiner Resultate.

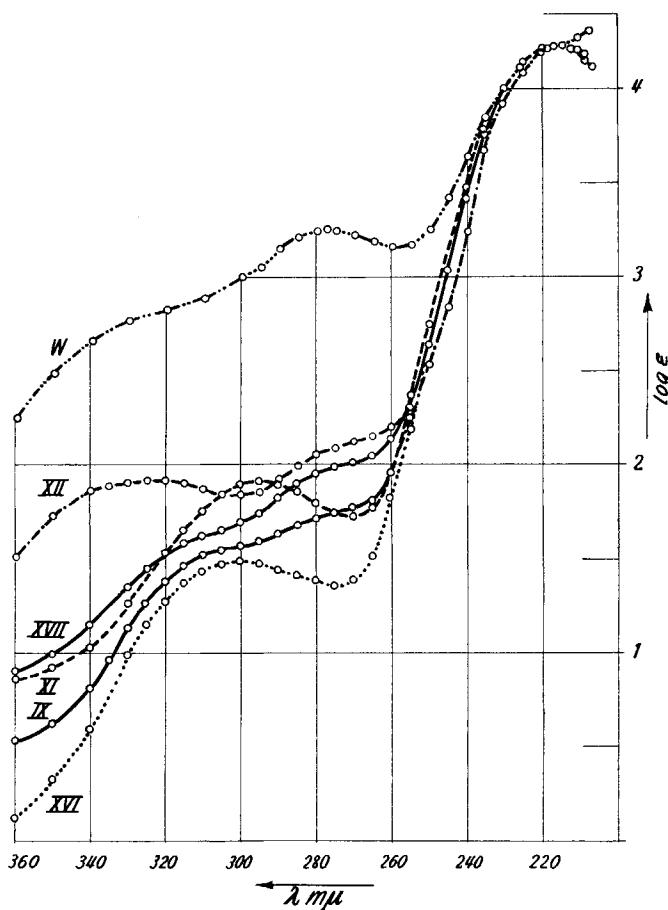


Fig. 8.

Ultraviolet-Absorptionsspektrum in Alkohol¹⁾

Kurve IX = Strophanthidin aus *P. nigrescens*. Maximum bei 217 mμ; $\log \epsilon = 4,21$. Infexion bei 305 mμ; $\log \epsilon = 1,54$; berechnet auf $C_{23}H_{32}O_6$ (404,49).

Kurve XI = Nigrescigenin. Maxima bei 217 mμ; $\log \epsilon = 4,21$ und bei 295 mμ; $\log \epsilon = 1,95$; berechnet auf $C_{23}H_{32}O_7$ (420,49).

Kurve XII = Subst. E. Sche. 12. Maximum bei 216 mμ; $\log \epsilon = 4,21$. Infexion bei ca. 275 mμ; $\log \epsilon = 2,08$, sowie weiteres Maximum bei 325 mμ; $\log \epsilon = 1,90$; ber. auf $C_{25}H_{34}O_8$ (462,53).

Kurve XVI = Subst. E. Sche. 16. Maxima bei 216 mμ; $\log \epsilon = 4,21$ und bei 300 mμ; $\log \epsilon = 1,48$; ber. auf $C_{25}H_{34}O_7$ (446,52).

Kurve XVII = Subst. E. Sche. 17. Maximum bei 217 mμ; $\log \epsilon = 4,24$. Infexion bei 275 mμ; $\log \epsilon = 1,98$; ber. auf $C_{29}H_{42}O_{11}$ (566,63).

Kurve W = Amorphes Konzentrat W. Maximum bei 278 mμ; $\log \epsilon = 3,25$; ber. auf $C_{29}H_{42}O_{11}$ (566,63). Starke Endabsorption.

¹⁾ Aufgenommen von Herrn Dr. P. Zoller, Organ.-chem. Anstalt der Universität Basel, mit einem Beckman-Quartz-Spektrophotometer Modell DU.

bei $325 \text{ m}\mu$ etwas stärker absorbierende Gruppierung (oder Verunreinigung?) verdeckt wird.

Substanz E. Sche. 16. Dieser, in relativ geringer Menge erhaltene Stoff zeigte Smp. $236-239^\circ$ und $[\alpha]_D^{17} = +54,8^\circ \pm 3^\circ$ (in Chloroform). Die Analysen passten am besten auf die Formel $C_{25}H_{34}O_7$ oder $C_{27}H_{36}O_8$. Auch dieser Stoff war methoxylfrei, zuckerfrei und liess sich mit Pyridin-Acetanhydrid bei 20° nicht acetylieren. Das UV.-Absorptionsspektrum (vgl. Kurve XVI, berechnet auf $C_{25}H_{34}O_7 = 446,52$) zeigte neben dem normalen Maximum bei ca. $216 \text{ m}\mu$ noch ein zweites bei ca. $300 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 1,48$), das auf eine Carbonylgruppe deutet. Der Stoff zeigte in vielen Eigenschaften grosse Ähnlichkeit mit Strophanthidin-acetat. Möglicherweise ist er mit diesem isomer. Eine Identität konnte dagegen mit Sicherheit durch die Mischprobe und durch die verschiedene Laufgeschwindigkeit im Papierchromatogramm (vgl. Nr. 11 und 12 in Fig. 2) ausgeschlossen werden. Auch die spez. Drehung war merklich verschieden.

Substanz E. Sche. 17. Dieser Stoff wurde erst nach fermentativem Abbau in sehr geringer Menge erhalten. Er zeigte Smp. $225-233^\circ$ (Zers.) und $[\alpha]_D^{15} = -19,7^\circ \pm 3^\circ$ (in Wasser). Er war methoxylfrei, enthielt jedoch Zucker. Die Analyse passte auf die Formel $C_{29}H_{42}O_{11}$. Das hohe Maximum bei $217 \text{ m}\mu$ im UV.-Absorptionsspektrum (vgl. Kurve XVII in Fig. 8) wäre mit einer solchen gut verträglich. Daneben ist noch eine deutliche Inflexion sichtbar, die von einem teilweise überlagerten Maximum bei ca. $275 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = \text{ca. } 1,98$) herühren könnte, sowie eine weitere schwache Inflexion bei ca. $300-310 \text{ m}\mu$. Das Acetat dieses Stoffes kristallisierte bisher nicht. Beim Versuch, Substanz E. Sche. 17 mit Takadiastase abzubauen, blieb sie unverändert.

Diskussion der Ergebnisse.

Auffallend ist, dass bereits die unfermentierten Extrakte¹⁾ erhebliche Mengen freier Aglykone, insbesondere Strophanthidin und etwas Aglykonacetate enthielten. Die Hauptmenge der digitaloiden Derivate stellen aber trotzdem die eigentlichen Glykoside dar, die als kompliziertes Gemisch wasserlöslicher Stoffe vorlagen. Obgleich es bisher nicht gelungen ist, einheitliche krist. Bestandteile daraus zu isolieren (ausser Spuren der Substanz E. Sche. 17), erlauben insbesondere die Abbaureultate mit Fermenten einige begründete Vermutungen auf-

¹⁾ Es ist natürlich möglich, dass schon während der Extraktion des Materials mit Wasser ein gewisser fermentativer Abbau eingetreten ist, obwohl es vorher längere Zeit unter Alkohol aufbewahrt wurde, welcher die Hydrolyse verhindert. Es ist bekannt, dass *Periploca graeca* glykosidspaltende Enzyme enthält²⁾³⁾. Daher ist das Vorhandensein von solchen auch in *P. nigrescens* naheliegend.

²⁾ *Th. Solacolu & G. Hermann*, C. r. Soc. biol. **117**, 1138 (1934).

³⁾ *A. Stoll & J. Renz*, Helv. **22**, 1193 (1939).

zustellen. Vom Schneckenferment¹⁾ sowie der Takadiastase²⁾ und dem verwandten Luizym³⁾ ist bekannt, dass sie einige digitaloide Glykoside bis zur Aglykonstufe abzubauen vermögen, vorausgesetzt, dass diese als Zucker ausschliesslich D-Glucose enthalten⁴⁾. Für Strophantobiase ist ein ähnlicher Abbau bis zur Aglykonstufe unseres Wissens nie beschrieben worden. Es ist aber sehr wohl möglich, dass dieses Ferment in geeigneten Fällen einen solchen Abbau wohl zu erreichen gestattet, und dass es speziell Strophantidin- β -D-glucosid und ähnlich gebaute Stoffe zu spalten vermag. Eine Kontrolle war leider nicht durchführbar, da uns dieses Glykosid in reiner Form nicht zugänglich war.

Das durch fraktioniertes Ausschütteln vorgereinigte Glykosidgemisch (Chloroform-Alkohol-2:1-Extrakt G) war nach Papierchromatographie und nach der Art der Vorreinigung praktisch frei von Strophantidin. Nach der Fermentierung mit Strophantobiase gab es aber merkliche Mengen davon, ausserdem noch Nigrescigenin⁵⁾ und etwas Strophantidol. Ebenso gab das Konzentrat W nach Fermentierung mit Takadiastase eine merkliche Menge (ca. 12 % der Theorie) krist. Strophantidin. Wir glauben daher, dass das ursprüngliche Glykosidgemisch unter anderem die D-Glucoside von Strophantidin, Strophantidol und Nigrescigenin enthielt. Auch Derivate mit 2 Mol D-Glucose wären möglich. Diglucoside von so sauerstoffreichen Aglykonen wie Strophantidin und Nigrescigenin sollten aber sehr wasserlöslich sein und sich mit Chloroform-Alkohol-(2:1)-Gemischen nur sehr schwer, mit Chloroform-Alkohol-(9:1)-Gemischen gar nicht mehr aus Wasser ausschütteln lassen. Im Konzentrat W kann als fermentativ spaltbares Strophantidinderivat daher nur das Monoglucosid enthalten gewesen sein. Eine definitive Abklärung wird erst nach präparativer Isolierung der Glykoside in reiner Form möglich sein. Wie gezeigt wurde, ist die Verteilungschromatographie dafür geeignet.

Für diese Arbeit standen uns Mittel aus den *Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes* zur Verfügung, wofür auch hier bestens gedankt sei.

¹⁾ M. G. Tanret, C. r. **198**, 1637 (1934); M. Frèrejacque, C. r. **225**, 695 (1947); **226**, 835 (1948); H. Huber, F. Blidenbacher, K. Mohr, P. Speiser & T. Reichstein, Helv. **34**, 46 (1951).

²⁾ A. Stoll, J. Renz & A. Brack, Helv. **34**, 397 (1951), benützten ein selbst bereitetes Präparat aus *Aspergillus oryzae*; vergl. auch die Spaltung von „Xysmalobin“ im exper. Teil dieser Arbeit; M. Frèrejacque & V. Hasenfratz, C. r. **226**, 268 (1948), haben Takadiastase erfolgreich zur Spaltung von Tanghinosid benützt, das damit allerdings nur bis zur Monoglykosidstufe abgebaut wird.

³⁾ R. Tschesche, K. Sellhorn & K. H. Brathge, B. **84**, 576 (1951).

⁴⁾ Erfolg und Ausmass der Spaltung scheint aber auch vom Aglykon etwas abhängig zu sein.

⁵⁾ Beim Nigrescigenin ist es nicht völlig sicher, dass dieser Stoff im Extrakt G abwesend war, da er sich mit reinem Chloroform aus Wasser kaum ausschütteln lässt.

Experimenteller Teil.

Alle Smp. sind auf dem *Kofler-Block* bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze bei hier benützter Ausführung bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Drehung wurden 1 Std. bei 0,01 Torr und 60° getrocknet, zur Analyse, sofern nichts anderes angegeben, 5 Std. bei 0,01 Torr und 100° mit Einwage im Schweinchen. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Äther, Chloroform oder Chloroform-Äther (1:3), Waschen mit 2-n. HCl (bei CrO_3 -Oxydationen mit 2-n. H_2SO_4), 2-n. Sodalösung und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen bei 35–40° (Vakuum). Al_2O_3 zur Chromatographie wurde ohne Anwendung von Säure von Alkali befreit¹⁾, und bei 180–190° reaktiviert. „Silikatgemisch“ ist das nach *Dobriner, Lieberman & Rhoads*²⁾ bereitete Gemisch von Mg-Silikat mit gewaschener Kieselgur (2:1 Gewichtsteile). Ausführung der Papierchromatographien nach *Schindler & Reichstein*³⁾ sowie *Schenker, Hunger & Reichstein*⁴⁾. *Raymond*-Reaktion⁵⁾, *Legal*-Reaktion⁶⁾, Zuckernachweis⁷⁾ und *Keller-Kiliani*-Reaktion⁸⁾ wurden nach früheren Angaben ausgeführt.

Vorbereitung des Pflanzenmaterials.

Insgesamt lagen 16,55 kg 1–2 cm dicke Zweige vor, die 3 Tage nach dem Sammeln (19. 2. 50) in Basel ankamen. Sie zeigten keinerlei Fäulnis- oder Zersetzungsscheinungen und wurden sofort wie folgt vorbereitet: Die dunkelbraune Rinde wurde sorgfältig abgeschält bzw. abgeschabt, Holz (3,95 kg) und Rinde (12,6 kg) getrennt in Flaschen abgefüllt, mit 95-proz. Alkohol bedeckt und bis zur Verarbeitung verschlossen im Dunkeln bei 15–20° stehengelassen.

Untersuchung der Rinde (0,32 kg).

Nach 20tägigem Stehen wurde der Alkohol abgegossen und die Rinde ausgepresst. Dann wurden die ca. 5–10 cm langen Rindenstücke portionsweise mit insgesamt 2 Litern Wasser im Turmix zerkleinert, der Brei mit 10 cm³ Toluol vermischt und 3 Tage verschlossen bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde mit 2 Litern 95-proz. Alkohol vermischt und durch eine Schicht gewaschener Kieselgur⁹⁾ scharf abgenutscht und mit 50-proz. Alkohol nachgewaschen. Das verbliebene Material wurde nun nochmals mit 2,5 Litern 50-proz. Alkohol im Turmix zerkleinert, der Brei einen Tag verschlossen bei 20° stehengelassen und abgenutscht. Das Rindenmaterial wurde noch viermal mit je 1,5 Litern 50-proz. Alkohol je einen Tag stehengelassen und abgenutscht und zum Schluss noch einmal mit 1,5 Litern 70-proz. Alkohol bei 50° ca. 1 Std. extrahiert. Eine Probe des letzten Extrakts zeigte nach Entfernung des Alkohols im Vakuum keinen bitteren Geschmack mehr. Auch das verbliebene Rindenpulver war nicht mehr bitter und wurde verworfen.

Die vereinigten Extrakte (ca. 15 Liter) wurden im Vakuum bei 40° auf 200 cm³ eingeengt. Das Konzentrat wurde mit 200 cm³ 95-proz. Alkohol und dem frisch aus 400 g Bleiacetat-trihydrat mit der berechneten Menge verd. NaOH gefällten und grob gewaschenen

¹⁾ *J. v. Euw, A. Lardon & T. Reichstein*, Helv. **27**, 1292, Fussnote 2 (1944).

²⁾ *K. Dobriner, S. Lieberman & C. P. Rhoads*, J. Biol. Chem. **172**, 241 (1948).

³⁾ *O. Schindler & T. Reichstein*, Helv. **34**, 108 (1951), mit der von *H. Hegediis, Ch. Tamm & T. Reichstein*, Helv. **36**, 364 (1953), angegebenen Abänderung zum Imprägnieren der Streifen.

⁴⁾ *E. Schenker, A. Hunger & T. Reichstein*, Helv. **37**, 680 (1954).

⁵⁾ *W. D. Raymond*, Analyst **63**, 478 (1938); **64**, 113 (1939); Ausführung nach ³⁾.

⁶⁾ *W. A. Jacobs & A. Hoffmann*, J. Biol. Chem. **67**, 333 (1926).

⁷⁾ *P. R. O. Bally, K. Mohr & T. Reichstein*, Helv. **34**, 1740 (1951).

⁸⁾ *J. v. Euw & T. Reichstein*, Helv. **31**, 883 (1948).

⁹⁾ Verwendet wurde Celite Nr. 545 der *Johns Manville Intern. Corporation*, New York, bezogen von der Firma *Schneider & Co.*, Winterthur. Das Material wurde zuerst mehrmals mit Wasser und Alkohol ausgekocht, wodurch eine merkliche Menge Verunreinigungen entfernt wurden. Es wurde in 50-proz. Alkohol aufgeschlemmt auf die Nutsche gebracht.

Pb(OH)_2 ¹⁾ versetzt und 15 Min. energisch geschüttelt. Dann wurde etwas gewaschene Kieselgur (Hyflo Super Cel) zugegeben und durch eine Schicht desselben Materials abgenutscht und mit 50-proz. Alkohol nachgewaschen. Das leicht alkalische, klare Filtrat wurde mit verd. H_2SO_4 auf $\text{pH} = 6$ gebracht, das ausgefallene PbSO_4 durch Filtration entfernt und die dunkelbraune Lösung im Vakuum auf 100 cm^3 eingeengt. Eine Prüfung auf Alkaloide fiel negativ aus.

Die erhaltene Suspension wurde viermal mit je 300 cm^3 Äther, dann fünfmal mit je 200 cm^3 Chloroform ausgeschüttelt. Die der Reihe nach (im Gegenstrom) zweimal mit je 25 cm^3 Wasser, einmal mit 25 cm^3 2-n. Sodalösung und zweimal mit je 25 cm^3 Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 1,053 g (0,33%) Ätherextrakt (A) als intensiv grünes, schwach bitteres Öl und 0,168 g (0,052%) Chloroformextrakt (B) als dunkelbraunen, bitteren Schaum.

Die wässrige Phase und das erste Waschwasser wurden nun zusammen im Vakuum auf 100 cm^3 eingeengt und zwölfmal mit je 150 cm^3 Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase war nicht mehr bitter, *Raymond*-Reaktion: negativ (verworfen). Die wie oben gewaschenen und getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 1,938 g (0,60%) Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt (C) als dunkelbraunen, bitteren Schaum.

Trennung des Ätherextrakts (A).

Die 1,053 g Material wurden an $31 \text{ g Al}_2\text{O}_3$ chromatographiert. Fraktion 5 (285 mg, eluiert mit Benzol-Chloroform (4:1)) gab aus Äther-Methanol 42 mg feine farblose Nadeln, Smp. 130—134°. Diese gaben bei der *Legal*-Probe keine Färbung und wurden nicht weiter untersucht.

Prüfung des Chloroformextrakts (B).

Die 168 mg Material wurden an $5,1 \text{ g Al}_2\text{O}_3$ chromatographisch in 20 Fraktionen zerlegt. Keine davon gab Kristalle.

Untersuchung des Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakts (C).

Die 1,938 g Extrakt C wurden in 100 cm^3 Wasser gelöst, mit 2 g Strophanthobiase-Präparat (aus Samen von *Strophanthus kombé*, l. c.) und 3 cm^3 Toluol vermischt und verschlossen 3 Tage bei 37° stehengelassen. Dann wurde im Vakuum bei 40° auf 50 cm^3 eingeengt, mit 300 cm^3 95-proz. Alkohol versetzt und durch eine Schicht gewaschene Kieselgur abgenutscht und gut mit Alkohol nachgewaschen. Das klare Filtrat wurde im Vakuum auf 50 cm^3 eingeengt, zur Entfernung von Alkoholresten nochmals mit 50 cm^3 Wasser versetzt und erneut im Vakuum auf 50 cm^3 eingeengt. Dann wurde viermal mit je 125 cm^3 Äther, sechsmal mit je 125 cm^3 Chloroform und sechsmal mit je 150 cm^3 Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Die wie oben gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 0,673 g (34,8%) Ätherextrakt (CA) als braunes, bitteres Harz, 0,172 g (8,9%) Chloroformextrakt (CB) als braunen, bitteren Schaum und 0,505 g (26%) Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt (CC) als braunen, bitteren Schaum.

Der Ätherextrakt CA wurde an Al_2O_3 chromatographiert, gab aber keine Kristalle. Der Chloroformextrakt CB wurde ebenfalls an Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol (99:1) eluierten Fraktionen (59 mg) gaben aus Methanol-Äther 9 mg krist. Strophanthidin, Smp. 144—146° (Mischprobe, Farbreaktion, papierchromatogr. Vergleich).

Der Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt CC (0,505 g) wurde mit 5 cm^3 abs. Pyridin und 3 cm^3 Acetanhydrid 2 Tage bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 0,882 g rohes Acetogemisch. Dieses wurde an Al_2O_3 chromatographisch in 25 Fraktionen zerlegt, von denen aber keine kristallisierte.

Untersuchung des entrindeten Holzes (total 3,95 kg).

Die Verarbeitung des Holzes geschah in 3 Ansätzen, prinzipiell gleich wie bei der Rinde, mit geringen Abweichungen.

Ansatz 1 (0,5 kg Holz). Zur ersten Zerkleinerung diente 1 Liter 95-proz. Alkohol, zur zweiten 1,7 Liter Wasser, worauf 2 Tage mit 10 cm^3 Toluol stehengelassen und nach

¹⁾ Das feuchte Pb(OH)_2 wurde zuerst für sich mit 50-proz. Alkohol aufgeschlemmt.

Zusatz von 1,7 Liter Alkohol abgepresst wurde. Es folgte eine Extraktion mit 1,5 Liter 50-proz. Alkohol und eine dritte Zerkleinerung mit 1,8 Litern 75-proz. Alkohol. Dann wurde noch zweimal mit je 2 Litern 50-proz. Alkohol bei 50° extrahiert. Die vereinigten Extrakte (12,5 l) wurden wieder auf 200 cm³ eingeengt und nach Zusatz von 200 cm³ Alkohol mit Pb(OH)₂ gereinigt. — Das erhaltene, leicht saure 50-proz. alkohol. Filtrat (1200 cm³) wurde dreimal mit je 1,2 Litern Petroläther ausgeschüttelt. Die zweimal mit je 50 cm³ gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge gaben 1,13 g (0,23%) Petrolätherextrakt (dunkelgrünes Öl, verworfen).

Die verbliebene alkoholisch wässrige Phase wurde einmal mit 1,2 Litern Chloroform und dann noch dreimal mit je 800 cm³ Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Die jetzt verbliebene wässrige Phase (ca. 550 cm³) wurde zusammen mit dem ersten Waschwasser auf 150 cm³ eingeengt und noch dreimal mit je 300 cm³ Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt, worauf sie nicht mehr bitter war und verworfen wurde. Die mit wenig Wasser, Sodalösung und Wasser gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge gaben nach dem Eindampfen im Vakuum 6,63 g (1,3%) rohes Glykosidgemisch als dunkelbraunen, stark bitter schmeckenden Schaum (2,3 K. E./mg, *Hatcher-Test*).

5,63 g (entspr. 425 g Holz) dieses Extrakte wurden in 400 cm³ Wasser gelöst und die erhaltene Suspension zunächst viermal mit je 500 cm³ Äther, dann viermal mit je 400 cm³ Chloroform und viermal mit je 400 cm³ Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase und das erste Waschwasser wurden dann zusammen im Vakuum auf 100 cm³ eingeengt und nochmals viermal mit je 200 cm³ desselben Gemisches ausgeschüttelt. Sie war hierauf nicht mehr bitter und wurde verworfen. Die wie bei der Rinde gewaschenen und getrockneten Auszüge gaben: 1,47 g (0,35%) Ätherextrakt (D) als dunkelgrünes, schwach bitteres Öl (0,52 K.E./mg, *Hatcher-Test*), 1,21 g (0,28%) Chloroformextrakt (E) als braunen, bitteren Schaum (2,8 K. E./mg, *Hatcher-Test*) und 2,91 g (0,68%) Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt (G) als dunkelbraunen, stark bitteren Schaum (4,25 K. E./mg, *Hatcher-Test*).

Ansatz 2 (1,68 kg Holz). Zuerst mit 4,5 Litern Wasser + 40 cm³ Toluol 3 Std. geweicht, durch fünfmaliges Passieren im Turmix möglichst fein zerkleinert und 3 Tage stehen lassen. Nach Zusatz von 5 l Alkohol abgepresst. Dann dreimal je 2 Tage bei 20° mit je 7 Litern 50-proz. Alkohol und einmal mit 6 Litern 75-proz. Alkohol bei 50° extrahiert. Vereinigte Extrakte (ca. 36 Liter) im Vakuum auf 1 Liter eingeengt, mit 1 Liter Alkohol versetzt und mit Pb(OH)₂ (aus 1,6 kg Pb-Acetat-trihydrat) gereinigt. Mit H₂SO₄ auf pH = 6 gebracht, filtriert, Filtrat im Vakuum auf 1,3 Liter eingeengt, mit 1,3 Litern Alkohol versetzt und zweimal mit je 1 Liter Petroläther ausgeschüttelt. Auszüge dreimal mit je 100 cm³ 50-proz. Alkohol gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft, gaben 1,63 g (0,1%) Petrolätherextrakt (verworfen). Die wässrig-alkoholische Lösung im Vakuum auf 1,3 Liter eingeengt, viermal mit je 1 Liter Äther ausgeschüttelt. Dann wurde die wässrige Phase im Vakuum auf 300 cm³ eingeengt und sechsmal mit je 400 cm³ Chloroform, dann fünfmal mit je 400 cm³ Chloroform-Alkohol (2:1), und nach erneutem Einengen auf 150 cm³ noch achtmal mit je 150 cm³ Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Erhalten wurden: 3,24 g (0,19%) Ätherextrakt (D); 7,195 g (0,43%) Chloroformextrakt (E) und 18,60 g (1,11%) Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt (G).

Ansatz 3 (1,77 kg Holz). Die Verarbeitung geschah wie bei Ansatz 2 und gab¹⁾: 1,74 g (0,1%) Petrolätherextrakt, 5,30 g (0,30%) Ätherextrakt (D), 8,86 g (0,50%) Chloroformextrakt (E) und 24,20 g (1,37%) Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt (G).

Untersuchung des Ätherextrakts (D).

Im Papierchromatogramm (Nr. 1 in Fig. 1a und 1b) wurde nur ein Fleck erhalten, der Strophanthidin entsprach.

¹⁾ Geringe Unterschiede in der Ausbeute sind teilweise dadurch bedingt, dass der abgegossene Alkohol, der bereits einen grossen Teil der Glykoside enthielt, nicht sehr genau dem verbleibenden Holz zugemessen werden konnte. Die Totalausbeute aus den ganzen 3,95 kg gibt daher ein genaueres Mass.

3,24 g Extrakt D (aus Ansatz 2) gaben aus Methanol zuerst 0,12 g farblose Nadeln, Smp. 282—286°. Sie waren nicht bitter, zeigten mit 84-proz. H_2SO_4 sowie bei der *Legal*-Probe keine Färbung und wurden nicht weiter untersucht.

Die Mutterlauge gab aus Methanol-Äther 0,323 g rohes Strophanthidin, Smp. 138—143°. Die restliche Mutterlauge wurde mit 1,07 g (entspr. ca. 300 g Holz) Extrakt D aus Ansatz 1 vereinigt (zusammen 3,87 g) an Al_2O_3 chromatographisch in 34 Fraktionen getrennt.

Die ersten 16 mit Benzol-Chloroform-Gemischen und reinem Chloroform eluierten Fraktionen gaben 2,24 g Öl; *Raymond*-Reaktion negativ.

Die Fraktionen 18—22 (total 678 mg, eluiert mit Chloroform-Methanol (99:1)) gaben aus Methanol-Äther 496 mg rohes Strophanthidin, Smp. 138—142°. Totalausbeute 819 mg aus ca. 1,98 kg Holz (entspr. 1,63 g auf 3,95 kg).

Die weiteren, mit Chloroform-Methanol und reinem Methanol erhaltenen Fraktionen gaben nur noch 0,93 g amorphes Material.

Untersuchung des Chloroformextrakts E.

Extrakt E wurde papierchromatographisch in drei Systemen geprüft (Nr. 2 in Fig. 1 a, 1 b und 1 c). Die beste Trennung gab Formamid-Chloroform, wobei insgesamt 6 Flecke erhalten wurden. Drei davon entsprachen Subst. E. Sche. 12, Strophanthidin und Strophanthidol, die übrigen 3 wurden nicht identifiziert.

Tabelle 5.
Trennung von 8,86 g Chf.-Extrakt E an Al_2O_3 .

Frak-tions-nummer	Lösungsmittel	Eindampfrückstand		
		Gewicht in mg	Habitus bzw. Smp.	Legal-Reaktion
1—5	Benzol-Chloroform (2:3) . . .	591	Öl	—
6	„ „ (1:9) . . .	64	„	—
7	„ „ (1:9) . . .	178	226—233°	+
8	„ „ (1:9) . . .	169	219—224°	+
9	„ „ (1:9) . . .	117	amorph	+
10	Chloroform	869	amorph	+
11	„	1842	138—142°	+
12	„	1686	138—142°	+
13	„	927	138—142°	+
14	„	565	134—139°	+
15	„	277	135—139°	+
16	„	190	136—140°	+
17	Chloroform-Methanol (99:1) .	175	131—134°	+
18	„ „ (99:1) .	462	135—139°	+
19	„ „ (99:1) .	287	138—142°	+
20	„ „ (98:2) .	163	139—143°	+
21	„ „ (98:2) .	89	129—135°	+
22	„ „ (95:5) .	104	137—141°	+
23	„ „ (95:5) .	63	128—134°	+
24	„ „ (9:1) .	71	amorph	+
25	„ „ (7:3) .	67	„	+
26	„ „ (1:1) .	41	„	+
27	„ „ (1:1) .	13	„	—
28—30	Methanol	63	„	—

Aus den Chloroformextrakten E liess sich ein erheblicher Teil des Strophanthidins direkt kristallisieren. Dieses Kristallisat war nach Papierchromatographie aber nicht rein und enthielt besonders noch Strophanthidol. Daher wurden die 8,86 g Extrakt E aus Ansatz 3 direkt an 270 g Al_2O_3 chromatographiert. Zum Ablösen jeder Fraktion dienten je 900 cm³ der in Tab. 5 genannten Lösungsmittel.

Die Fraktion 7 gab aus Methanol-Äther 37 mg Subst. E. Sche. 12 in dünnen Plättchen vom Smp. 232–234° (Zers.).

Die Fraktion 8 gab aus Methanol-Äther 39 mg Subst. E. Sche. 16 in feinen, zu Drusen vereinigten Nadeln vom Smp. 236–239° (Zers.).

Die Fraktionen 11–21 gaben aus Äthylacetat-Äther 2,03 g Strophanthidin vom Doppel-Smp. 142–144°/228–241° (Zers.). Das Material war nach Papierchromatographie einheitlich.

Die Fraktionen 22–23 gaben aus Aceton-Äther 58 mg Strophanthidol, Smp. 141–143°.

Die übrigen Fraktionen kristallisierten nicht.

Nachdem festgestellt worden war, dass die Substanzen E. Sche. 12 und E. Sche. 16 sich nicht acetylieren lassen, wurden die Mutterlaugen der Fraktionen 7–8 sowie die amorphen Fraktionen 9–10 vereinigt¹⁾ und das Ganze (1257 mg) mit 5 cm³ abs. Pyridin und 6 cm³ Acetanhydrid 2 Tage bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung mit Chloroform gab 1228 mg Rohprodukt. Aus Methanol 594 mg feine Körner, Smp. 234–238°. Diese Kristalle gaben im Papierchromatogramm (Nr. 10 in Fig. 2) neben dem für Subst. E. Sche. 12 charakteristischen Fleck noch einen weiteren mit geringerer Laufgeschwindigkeit. Sie wurden an Al_2O_3 chromatographiert. Die erhaltenen Kristalle (284 mg) waren nach Papierchromatogramm reiner, aber noch nicht ganz einheitlich. Nochmalige Chromatographie und Umkristallisieren aus Methanol-Äther, dann aus Methanol-Wasser gab 203 mg reine Subst. E. Sche. 12 in rechteckigen Plättchen, Smp. 231–235°.

Untersuchung des Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakts (G).

Orientierende Fermentversuche. Ansatz und Aufarbeitung geschah gleich wie bei der Rinde beschrieben. Zum Ausschütteln wurden zwei bis vier verschiedene Lösungsmittel benutzt.

Schneckenferment: 2,12 g Extrakt G in 400 cm³ Wasser mit 3 g Schneckenferment-Trockenpräparat und 3 cm³ Toluol 3 Tage bei 37° stehengelassen. Erhalten wurden 406 mg Chloroformextrakt als brauner, bitterer Schaum, 178 mg Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt als brauner, bitterer Schaum und 1,38 g Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt als brauner, bitterer Schaum.

Der Chloroformextrakt zeigte im Papierchromatogramm neben dem Strophanthidin auch den Strophanthidolfleck. Aus Methanol-Äther liessen sich 59 mg krist. Strophanthidin, Smp. 140–142°, isolieren.

Der Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt zeigte im Papierchromatogramm (Wasser: Butanol-Toluol (1:1)) bei einer aufgetragenen Menge von 0,5 mg zwei abgegrenzte, nicht identifizierte Flecke.

Der Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt zeigte im Papierchromatogramm (Butanol-Wasser) mit 0,3 mg Material einen runden und einen ca. 8 cm langen Fleck.

Enzym aus den Samen von Adenium multiflorum: 590 mg Extrakt G in 400 cm³ Wasser mit Essigsäure auf pH = 5 gebracht, mit 700 mg Enzympräparat und 1 cm³ Toluol 3 Tage bei 37° stehengelassen. Erhalten wurden 46 mg Chloroformextrakt (papierchromatographisch Strophanthidin nachgewiesen) sowie 504 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt. Letzterer gab im Papierchromatogramm (Wasser: Butanol) einen ca. 9 cm langen Fleck.

¹⁾ In allen diesen Anteilen war nach Papierchromatogramm Subst. E. Sche. 12 enthalten.

Luizym: 472 mg Extrakt G in 400 cm³ Wasser mit 1,5 g Luizym, 5 cm³ Toluol und Essigsäure auf pH = 5 versetzt, 3 Tage bei 37° stehengelassen. Erhalten wurden 118 mg Chloroformextrakt und 309 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt.

Ersterer gab mit 0,3 mg Substanz im Papierchromatogramm (Formamid-Chloroform) neben Strophanthidin noch zwei nicht identifizierte Flecke.

Der Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt gab mit 0,3 mg Substanz im Papierchromatogramm einen 6,5 cm langen Fleck.

Strophanthobiase: 5,48 g Extrakt G (entspr. ca. 468 g Holz) in 900 cm³ Wasser aufgenommen, die trübe Suspension mit 5 g Strophanthobiase-Präparat (aus Samen von *Strophanthus kombe*, l. c.) und 5 cm³ Toluol versetzt und 3 Tage bei 37° stehen gelassen, ergab:

0,345 g Ätherextrakt GDS,

1,155 g Chloroformextrakt GES,

1,815 g Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt GFS,

2,005 g Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt GGS.

Über die Resultate der biolog. Prüfung dieser vier Extrakte siehe theoret. Teil.

Im Extrakt GDS war im Papierchromatogramm (Formamid:Chloroform) nur ein schwacher Fleck erkennbar, der Strophanthidin entsprach. Aus 0,245 g dieses Extraktes konnten aus Aceton-Äther 17 mg krist. Strophanthidin erhalten werden. Der Chloroform-extrakt GES zeigte im Papierchromatogramm in 3 Systemen (Formamid: Chloroform-Benzol (5:7); Formamid: Chloroform und Wasser: Butanol-Toluol (1:1)) mit einer Substanzmenge von 0,5 mg insgesamt 5 Flecke, zwei davon entsprachen Strophanthidin und Strophanthidol. 1,062 g Extrakt GES (entspr. ca. 430 g Holz) wurden an 33 g Al₂O₃ chromatographiert, wobei 132 mg reines Strophanthidin erhalten wurden.

Der Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt GFS zeigte im Papierchromatogramm in 2 Systemen (Wasser: Butanol-Toluol (1:1) und Wasser: Butanol) mit 0,1—0,5 mg Substanz keine abgegrenzten Flecke, sondern nur eine langgezogene Zone. 1,706 g dieses Materials (entspr. ca. 440 g Holz) wurde an 51 g Al₂O₃ chromatographiert, worauf sich 57 mg Nigrescigenin sowie 77 mg eines Kristallgemisches isolieren liessen.

Der Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt GGS zeigte im Papierchromatogramm (Wasser: Butanol) mit 0,3—0,5 mg Substanz keine abgegrenzte Flecke. 1,170 g Material wurden an 30 g „Silikatgemisch“ chromatographiert.

Die Fraktionen 1—3 (eluiert mit Chloroform-Methanol) gaben 288 mg braunes Öl, *Raymond*-Reaktion negativ.

Die Fraktionen 4 und 5 (eluiert mit Chloroform-Methanol) gaben 449 mg amorphes Material, *Raymond*-Reaktion positiv.

Die Fraktionen 6 und 7 (zusammen 238 mg, eluiert mit Chloroform-Methanol (4:1)) gaben aus Methanol-Äther 14 mg feine Nadeln neben kleinen Körnern, Smp. 245—249°, die nicht weiter untersucht wurden. *Raymond*-Reaktion positiv.

Die Fraktionen 8—20 (eluiert mit Chloroform-Methanol und reinem Methanol) gaben zusammen 212 mg amorphes Material, *Raymond*-Reaktion positiv.

Die Fraktionen 4 und 5 sowie die Mutterlaugen der Fraktionen 6 und 7 wurden vereinigt (zusammen 617 mg). 101 mg dieser Mischung wurden mit 1 cm³ abs. Pyridin und 0,3 cm³ Acetanhydrid 2 Tage bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 126 mg rohes Acetat. Im Papierchromatogramm (Formamid: Benzol-Chloroform (5:7)) wurden mit 0,1 mg Substanz mindestens 3 verschiedene Flecke erhalten¹⁾. Der Rest des nicht acetylierten Gemisches (516 mg) wurde nochmals an 15,5 g Al₂O₃ chromatographiert. Zwei Fraktionen (zusammen 80 mg, eluiert mit Chloroform-Methanol (4:1)) gaben aus Methanol-Äther wenig farblose Körner, Smp. 210—242°, *Legal*-Reaktion positiv; *Keller-Kiliani*-Reaktion negativ; Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄: gelb, schokoladebraun (1—60 Min.), olivgrün (2 Std.).

¹⁾ Zum Entwickeln der Papierchromatogramme empfiehlt sich bei Glykosid- und Aglykon-acetaten die Anwendung einer 10-proz. ätherischen Lösung von m-Dinitrobenzol.

Hauptversuch mit Strophanthobiase. 37,0 g Extrakt G in 1,2 Litern Wasser mit Essigsäure auf $\text{pH} = 5$ gebracht, die trübe Emulsion mit 14 g frisch bereitetem Strophanthobiase-Präparat und 15 cm³ Toluol vermischt, 4 Tage unter öfterem Umschwenken bei 37° stehengelassen. Im Vakuum bei 35° auf 400 cm³ eingeengt, auf 0° abgekühlt und in 2,5 Litern stark vorgekühlten (festes CO₂) Alkohol eingegossen. Etwas festes CO₂ zugegeben, bei –10° abfiltriert und Niederschlag (regeneriertes Enzym) mit Alkohol und Äther bei –10° gewaschen und sofort im Vakuum getrocknet. Filtrat im Vakuum vollständig von Alkohol befreit und zuerst sechsmal mit je 500 cm³ Chloroform, dann sechsmal mit je 500 cm³ Chloroform-Alkohol (9:1) ausgeschüttelt. Die wie üblich gewaschenen und getrockneten Auszüge gaben 4,87 g Chloroformextrakt GESH und 15,99 g Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt GFSH.

Die wässrige Phase wurde im Vakuum von Resten organischer Lösungsmittel befreit, mit Wasser etwas verdünnt und nach Zusatz des in 400 cm³ Wasser gelösten regenerierten Enzyms wieder fermentiert. Aufarbeitung wie oben gab 1,60 g Chloroformextrakt GESHN1 und 2,05 g Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt GFSHN1. Regenerierung des Enzyms und Nachbehandlung der wässrigen Phase wurden noch zweimal wiederholt, wobei noch

1,35 g Chloroformextrakt GESHN2
und 0,17 g Chloroformextrakt GESHN3
sowie 0,75 g Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt GFSHN2
und 0,25 g Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt GFSHN3

erhalten wurden.

Die zuletzt verbliebene wässrige Phase wurde noch zehnmal mit je 500 cm³ Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Nach Waschen und Trocknen resultierten 6,18 g Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt GGSH. Die nunmehr verbliebene wässrige Phase wurde im Vakuum auf 250 cm³ eingeengt, mit festem Na₂SO₄ halb gesättigt und nochmals zehnmal mit je 300 cm³ Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Erhalten wurden 2,35 g Extrakt, der aber keine Färbung bei der *Legal*-Reaktion lieferte und verworfen wurde.

Die Chloroformextrakte GESH und GESHN1 wurden präparativ nicht untersucht. Nach Papierchromatographie (mit 0,3 mg Substanz) enthielten sie hauptsächlich Strophanthidin, daneben Strophanthidol und 3–4 weitere, mit *Raymond*-Reagens positiv reagierende Stoffe. (Aus dem analogen Extrakt GES konnte präparativ bisher nur Strophanthidin isoliert werden).

Die 1,35 g Chloroformextrakt GESHN2 gaben aus Methanol-Äther 48 mg krist. Strophanthidin (nach Papierchromatogramm frei von Strophanthidol).

Die 0,17 g Chloroformextrakt GESHN3 gaben aus Methanol-Äther 38 mg rohes Strophanthidol (Smp. 134–138°), das nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther 27 mg reines Strophanthidol, Smp. 137–141°, lieferte (charakterisiert als Acetat).

Trennung der Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakte GFSH, GFSHN1–3. Die obigen Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakte GFSH, GFSHN1–3 aus Strophanthobiase-Spaltung (zusammen 19,04 g) wurden mit den Mutterlaugen der Fraktionen Nr. 8, 9, 12–14 und den amorphen Fraktionen Nr. 10–11, 15–25 aus der Chromatographie von Extrakt GFS (zusammen 0,85 g) vereinigt und das Ganze (19,89 g) an 600 g Al₂O₃ chromatographiert. Zum Nachwaschen dienten für jede Fraktion je 2 Liter Lösungsmittel (vgl. Tab. 6, Seite 1028).

Die Fraktionen 10–13 (total 1,82 g) gaben aus Methanol-Äther, dann aus Methanol-Wasser 658 mg Nigrescigenin vom Doppel-Smp. 164–168°/244–247°. Durch nochmalige Chromatographie der Mutterlaugen konnten weitere 53 mg Nigrescigenin isoliert werden. Totalausbeute aus 1,706 g Extrakt GFS (entspr. ca. 400 g Holz) und 19,04 g Extrakte GFSH und GFSHN1–3 (entspr. ca. 3,18 kg Holz) 768 mg (0,0215%).

Fraktion 17 gab aus Methanol-Äther 79 mg rohe Subst. E. Sche. 17 in Nadeln, Smp. 223–229°, die aber nach Papierchromatogramm (Wasser: Butanol-Toluol (1:1))

nicht einheitlich waren, und aus der Mutterlauge noch 77 mg weniger reine Kristalle. Nochmalige Chromatographie der vereinigten Rohkristalle (156 mg) gab aus Methanol-Äther 48 mg reine Subst. E. Sche. 17 in zu Drusen vereinigten feinen Nadeln, Smp. 225–233° (Zers.). Nach Papierchromatogramm im System Wasser: Butanol-Toluol (1:1) einheitlich.

Tabelle 6.

Trennung von 19,89 g der Extrakte GFSH und GFSH 1—3 an Al_2O_3

Frak-tions-nummer	Lösungsmittel	Eindampfrückstand		
		Gewicht in mg	Habitus bzw. Smp.	Raymond-Reaktion
1	Benzol-Chloroform (1:4) . . .	31	Öl	—
2	“ “ (1:4) . . .	34	“	—
3	Chloroform	29	“	—
4	“	18	“	—
5	“	22	“	—
6	Chloroform-Methanol (99:1) . .	26	“	—
7	“ “ (99:1) . .	44	“	—
8	“ “ (97:3) . .	69	“	+
9	“ “ (97:3) . .	138	“	+
10	“ “ (97:3) . .	241	157–262°	+
11	“ “ (97:3) . .	860	231–234°	+
12	“ “ (97:3) . .	375	236–247°	+
13	“ “ (97:3) . .	348	231–234°	+
14	“ “ (95:5) . .	292	amorph	+
15	“ “ (95:5) . .	105	“	+
16	“ “ (9:1) . .	142	“	+
17	“ “ (9:1) . .	420	204–210°	+
18	“ “ (9:1) . .	172	amorph	+
19	“ “ (9:1) . .	386	202–211°	+
20	“ “ (4:1) . .	618	200–213°	+
21	“ “ (4:1) . .	458	198–204°	+
22	“ “ (4:1) . .	281	198–217°	+
23	“ “ (3:2) . .	1446	247–250°	+
24	“ “ (3:2) . .	1716	amorph	+ Konzen-trat W
25	“ “ (3:2) . .	1297	“	+
26	“ “ (3:2) . .	514	“	+
27	“ “ (3:2) . .	365	“	+
28	“ “ (2:3) . .	202	“	+
29	“ “ (2:3) . .	410	“	+
30	Methanol	348	“	+
31	“	402	“	+
32	“	146	“	+
33	Chloroform-Methanol (1:1) + 2% Eisessig	2454	“	—
34	Chloroform-Methanol (1:1) + 5% Eisessig	729	“	—
35	Chloroform-Methanol (1:1) + 5% Eisessig	780	“	—

Die Fraktionen 19–22 (zusammen 1,74 g) gaben 554 mg Kristallgemische (feine Nadeln und kleine Körner, Smp. 202–217°). Nach Papierchromatogramm waren beide Formen ungefähr gleichartige Gemische. Eine saubere Trennung gelang bisher nicht. *Raymond*-Reaktion positiv. Zuckerprüfung negativ. Dreimaliges Umkristallisieren aus Methanol-Äther, dann aus Methanol-Wasser gab als Spitzenfraktion 66 mg feine Körner, Smp. 252–256°. *Raymond*-Reaktion positiv.

Fraktion 23 (1,446 g) gab aus Methanol-Äther, dann aus Methanol-Wasser 12 mg feine Nadeln, Smp. 261–269°. *Raymond*-Reaktion positiv, Zuckerprobe negativ.

Die Mutterlauge von Fraktion 23 und die amorphen Fraktionen 24–26 gaben im Papierchromatogramm (vgl. Nr. 1, 2, 3 und 4 in Fig. 3a) dieselben drei bis vier Flecke. Sie wurden vereinigt (4,96 g) und als Konzentrat W bezeichnet.

Untersuchung von Konzentrat W. Dieses Material stellte ein hellbraunes, in Wasser ziemlich lösliches Harz dar. Geschmack stark bitter. *Raymond*-Reaktion stark positiv, Zucker-Prüfung: positiv, *Keller-Kilianni*-Reaktion: negativ. UV.-Absorptionsspektrum und biologische Wirksamkeit siehe theoret. Teil.

Acetat. 302 mg Konzentrat W mit 5 cm³ abs. Pyridin und 3 cm³ Acetanhydrid 3 Tage bei 20° stehengelassen gaben 358 mg rohes Acetat. Eine Probe (135 mg) wurde an Al₂O₃ chromatographiert, gab aber keine Kristalle. Zur Wasserabspaltung wurden 292 mg Acetatgemisch in 4 cm³ abs. Pyridin bei 0° mit 1 cm³ POCl₃ vermischt und nach Zusatz von 0,02 cm³ Wasser¹) 22 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung mit Chloroform-Äther gab 269 mg Rohprodukt, das auch nach Chromatographie und Impfen mit Anhydro-strophanthidin- β -D-glucosid-tetracetat²) nicht kristallisierte. Die grössten, fast farblosen Fraktionen gaben mit Tetranitromethan eine deutliche Gelbfärbung. Die Hauptfraktionen wurden vereinigt (166 mg), nachacetyliert und nochmals chromatographiert, doch konnten wiederum keine Kristalle erhalten werden³).

Benzoat. 72 mg Konzentrat W bei 0,01 Torr getrocknet, in 1,8 cm³ abs. Pyridin gelöst, bei 0° mit 0,4 cm³ reinstem Benzoylchlorid vermischt und 8 Std. unter H₂O-Ausschluss stehengelassen. Mit 0,5 cm³ Methanol versetzt und noch 2 Std. stehengelassen. Übliche Aufarbeitung und Trocknung bei 0,01 Torr und 60° gab 161 mg rohes Benzoat. Es wurde chromatographisch an 5 g Al₂O₃ in 33 Fraktionen getrennt, von denen keine kristallisierte.

Milde saure Hydrolyse. 639 mg Konzentrat W in 20 cm³ Methanol mit 20 cm³ 0,1-n. wässriger H₂SO₄ 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Methanol im Vakuum entfernt, mit 20 cm³ Wasser verdünnt und 25 Min. auf 62° erwärmt. Abgekühlt, dann sechsmal mit je 50 cm³ Chloroform, dann achtmal mit je 50 cm³ Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Die mit Soda und Wasser gewaschenen und getrockneten Auszüge gaben 49 mg Chloroformextrakt (*Raymond*-Reaktion: positiv) und 577 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt. Letzterer wird als durch milde saure Hydrolyse gereinigtes Konzentrat W bezeichnet.

Spaltung mit Takadiastase. 269 mg Konzentrat W (durch milde saure Hydrolyse gereinigt) in 10 cm³ Wasser mit Lösung von 408 mg Takadiastase⁴⁾ und 3 cm³ Toluol 4 Tage bei 37° stehengelassen. Aufarbeitung wie bei früheren Fermentansätzen gab 113 mg Chloroformextrakt sowie 96 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt.

Der Chloroformextrakt gab im Papierchromatogramm (vgl. Nr. 3 in Fig. 4) (Formamid:Chloroform) mit 0,1 mg Methanol drei Flecke, von denen einer Strophanthidin und der zweite Strophanthidol entsprach, während der dritte nicht identifiziert wurde. Die

¹⁾ K. Meyer & T. Reichstein, Helv. **30**, 1508 (1947).

²⁾ K. Reyle, K. Meyer & T. Reichstein, Helv. **33**, 1541 (1950).

³⁾ Zur Kontrolle wurden in einem Parallelversuch 139 mg reines Convallatoxin-triacetat (Smp. 239–243°) wie oben behandelt. Auch nach Chromatographie konnten keine Kristalle erhalten werden.

⁴⁾ Wir danken der Schweizerischen Ferment AG., Basel, auch hier für die Überlassung dieses Präparats. Das Ferment wurde zuerst mit „Xysmalobin“⁵⁾ ausprobiert und erwies sich dabei als gut wirksam.

⁵⁾ H. Huber, F. Blindenbacher, K. Mohr, P. Speiser & T. Reichstein, Helv. **34**, 65 (1951).

Hauptmenge (110 mg) wurde an $3,25\text{ g Al}_2\text{O}_3$ chromatographiert und gab 23 mg krist. Strophanthidin, Smp. $141-144^\circ$ (nach Papierchromatogramm rein). Die Mutterlaugen und wichtigsten amorphen Fraktionen (zusammen 84,4 mg) wurden mit Reagens T getrennt¹⁾ und gaben 16,2 mg aldehydfreie Anteile sowie 31,4 mg Aldehydgemisch. Keiner dieser zwei Teile kristallisierte bisher.

Trennung von Konzentrat W durch Verteilungschromatographie. Für die Trennung diente Säule Nr. 1²⁾ mit 194 g Kieselgur-Wasser (1:1) in Butanol-Benzol (1:1) eingefüllt.

249 mg Konzentrat W (durch milde saure Hydrolyse vorgereinigt) wurden in 3 g Wasser gelöst, mit 3 g Kieselgur vermischt in 20 cm^3 mit Wasser gesättigtem Butanol-Benzol (1:1) suspendiert auf die Säule gebracht und dann mit 10 g Kieselgur-Wasser (1:1) gedeckt. Dann wurde mit Butanol-Benzol (1:1), anschliessend mit Butanol-Benzol (3:1) und zum Schluss mit reinem Butanol chromatographiert. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug ca. 25 cm^3 pro Std. Die mit 105 g Kieselgur gefüllte Säule enthielt etwa 174 cm^3 leichte Phase. Die ersten 170 cm^3 Eluat gab nur 1,2 mg Eindampfrückstand; *Raymond*-Reaktion: negativ, verworfen. Die numerierten Fraktionen wurden erst anschliessend aufgefangen. Über das Resultat orientiert Tab. 7 sowie Fig. 7 und die Papierchromatogramme Nr. 5-16 in Fig. 3b.

Keine der erhaltenen Fraktionen kristallisierte bisher. Aus dem Resultat der Papierchromatographie (vgl. letzte Spalte der Tab. sowie Fig. 7) ist aber ersichtlich, dass mindestens in den Fraktionen 1-20, 32-35, 54-60 und 67-69 vier verschiedene *Raymond*-positive Stoffe in papierchromatographisch reiner Form vorlagen.

Untersuchung des Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakts GGSH. Eine Probe (673 mg) Extrakt GGSH wurde mit 35 cm^3 Methanol und 35 cm^3 0,1-n. wässriger H_2SO_4 25 Min. unter Rückfluss gekocht. Aufarbeitung wie bei milder Hydrolyse von Konzentrat W gab 168 mg Chloroformextrakt als braunes Öl, *Raymond*-Reaktion negativ, sowie 423 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt als braunes Harz. Diese Behandlung stellt somit eine gewisse Reinigung dar. 135 mg des erhaltenen Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakts wurden mit Pyridin-Acetanhydrid 2 Tage bei 18° acetyliert und gaben 174 mg braunes amorphes Acetatgemisch. Dieses lieferte im Papierchromatogramm (Formamid: Benzol-Chloroform (5:7)) mit 0,3 mg Substanz mindestens 4 Flecke (vgl. Fig. 5).

Versuch zur enzymatischen Spaltung. 550 mg Extrakt GGSH in 170 cm^3 Wasser mit 550 mg Takadiastase und 5 cm^3 Toluol 4 Tage bei 37° stehengelassen. Aufarbeitung wie bei anderen Fermentversuchen gab: 24 mg Chloroformextrakt, 58 mg Chloroform-Alkohol-(9:1)-Extrakt und 432 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt. Keiner dieser drei Teile kristallisierte.

Charakterisierung der krist. Stoffe.

Strophanthidin aus *Periploca nigrescens*. Aus Methanol-Äther farblose Prismen, Smp. $138-143^\circ$. Aus Methanol-Wasser kleine Prismen, Smp. $142-144^\circ$. Aus Äthylacetat-Äther Rhomben mit Doppel-Smp. $141-145^\circ$, Rekristallisation in Nadeln bei ca. $158-183^\circ$, definitiver Smp. $228-241^\circ$ (Zers.); $[\alpha]_D^{17} = +43,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,9939$ in Methanol).

9,941 mg Subst. zu $1,0002\text{ cm}^3$; $l = 1\text{ dm}$; $\alpha_D^{17} = +0,43^\circ \pm 0,02^\circ$

Gewichtsverlust bei Trocknung 4,04%.

3,850 mg Subst. gaben 9,57 mg CO_2 und 2,67 mg H_2O (S. W.)

$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{O}_6$ (404,49) Ber. C 68,29 H 7,97% Gef. C 67,83 H 7,77%

Der Stoff war methoxylfrei.

Authentisches Strophanthidin und die Mischprobe schmolzen gleich. Das Material war nach Papierchromatogramm einheitlich und zeigte dieselbe Laufgeschwindigkeit wie authentisches Material. Auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H_2SO_4 waren gleich. UV.-Absorptionsspektrum siehe theoret. Teil.

¹⁾ Ausführungsform nach *O. Schindler & T. Reichstein*, *Helv.* **34**, 521 (1951).

²⁾ *H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein*, *Helv.* **34**, 357 (1953).

Tabelle 7.
Verteilungschromatographie von 249 mg Konzentrat W.

Frak- tions- nummer	Mobile Phase	Erhaltene Eluate		
		Volu- men	Gewicht in mg	Resultat der Papierchromatographie
1	Butanol-Benzol (1:1) . .	20	5,3	Subst. I rein
2	„ „ (1:1) . .	10	6,5	
3	„ „ (1:1) . .	10	4,2	
4	„ „ (1:1) . .	10	5,2	
5	„ „ (1:1) . .	10	2,9	
6	„ „ (1:1) . .	10	4,2	
7	„ „ (1:1) . .	10	4,2	
8	„ „ (1:1) . .	10	1,8	
9	„ „ (1:1) . .	10	2,1	Subst. I rein
10	„ „ (1:1) . .	10	2,3	
11	„ „ (1:1) . .	10	2,1	
12	„ „ (1:1) . .	10	2,0	
13	„ „ (1:1) . .	10	1,9	
14	„ „ (1:1) . .	10	1,7	
15	„ „ (1:1) . .	10	1,7	
16	„ „ (1:1) . .	10	2,3	
17	„ „ (1:1) . .	10	0,9	
18	„ „ (1:1) . .	10	1,4	
19	„ „ (1:1) . .	10	1,5	
20	„ „ (1:1) . .	10	1,7	Subst. I rein
21	„ „ (1:1) . .	10	1,6	
22	„ „ (1:1) . .	10	1,6	
23	„ „ (1:1) . .	10	1,7	Subst. I + II
24	„ „ (1:1) . .	10	1,7	
25	„ „ (1:1) . .	10	1,8	
26	„ „ (1:1) . .	10	1,7	
27	„ „ (1:1) . .	10	2,1	Subst. II + wenig I
28	„ „ (1:1) . .	10	2,0	
29	„ „ (1:1) . .	10	2,2	
30	„ „ (1:1) . .	10	1,2	Subst. II + wenig I
31	„ „ (1:1) . .	10	2,9	
32	„ „ (1:1) . .	10	4,1	Subst. II rein
33	„ „ (1:1) . .	10	3,8	
34	„ „ (1:1) . .	10	4,3	
35	„ „ (1:1) . .	10	2,3	Subst. II rein
36	„ „ (1:1) . .	20	3,9	
37	„ „ (1:1) . .	20	2,3	
38	„ „ (3:1) . .	20	1,9	Subst. II + wenig III
39	„ „ (3:1) . .	20	3,8	
40	„ „ (3:1) . .	20	4,5	Subst. III + wenig II
41	„ „ (3:1) . .	30	7,4	
42	„ „ (3:1) . .	20	2,4	Subst. III + wenig II

Tabelle 7 (Fortsetzung).

Frak-tions-nummer	Mobile Phase	Erhaltene Eluate		
		Volumen	Gewicht in mg	Resultat der Papierchromatographie
43	Butanol-Benzol (3:1) . .	10	1,9	
44	" " (3:1) . .	10	1,2	
45	" " (3:1) . .	10	2,9	
46	" " (3:1) . .	10	1,3	
47	" " (3:1) . .	10	3,2	
48	" " (3:1) . .	20	4,7	Subst. III + wenig II
49	" " (3:1) . .	20	8,9	
50	" " (3:1) . .	10	9,8	Subst. III + wenig II
51	" " (3:1) . .	10	14,5	
52	Butanol	10	11,2	
53	"	10	9,9	
54	"	15	10,1	Subst. III rein
55	"	15	7,3	
56	"	15	5,4	
57	"	15	4,9	
58	"	15	3,2	
59	"	15	2,9	Subst. III rein
60	"	15	2,3	Subst. III rein
61	"	15	2,5	
62	"	15	2,6	
63	"	15	4,3	Subst. III + wenig IV
64	"	30	5,2	
65	"	50	6,4	
66	"	50	21,7	
67	"	100	6,2	Subst. IV rein
68	"	200	3,1	
69	Wasser	200	0,4	Subst. IV rein

Acetat. 47 mg Strophanthidin aus *Periploca nigrescens* mit 0,5 cm³ abs. Pyridin und 0,3 cm³ Acetanhydrid 2 Tage bei 18° stehengelassen geben 53 mg Rohprodukt. Aus Methanol-Äther-Petroläther, dann aus Aceton-Äther-Petroläther 45 mg farblose Plättchen, Smp. 238–240°; $[\alpha]_D^{18} = +36,6^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,065 in Methanol).

10,65 mg Subst. zu 1,0002 cm³; $l = 1$ dm; $[\alpha]_D^{18} = +0,39^\circ \pm 0,02^\circ$

3,425 mg Subst. geben 8,360 mg CO₂ und 2,324 mg H₂O (OAB)

C₂₅H₃₄O₇ (446,52) Ber. C 67,24 H 7,67% Gef. C 66,61 H 7,59%

Authentisches Material und die Mischprobe schmolzen gleich. Auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ waren gleich.

Strophanthidol aus *Periploca nigrescens*. Aus Aceton-Äther farblose Plättchen, Smp. 141–143°; $[\alpha]_D^{20} = +39,0^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,128 in Methanol).

11,28 mg Subst. zu 1,0002 cm³; $l = 1$ dm; $[\alpha]_D^{20} = 0,44^\circ \pm 0,02^\circ$

Authentisches Strophanthidol sowie die Mischprobe schmolzen gleich, auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ waren gleich, ebenso die Laufstrecken im Papierchromatogramm (Formamid : Chloroform).

Acetat. 27 mg Strophanthidol aus *Periploca nigrescens* wie oben acetyliert, gaben 31 mg rohes Acetat. Aus Aceton-Äther 28 mg farblose Plättchen, Smp. 189–191°; $[\alpha]_D^{16} = +48,1^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,541 in Chloroform).

5,41 mg Subst. zu 1,0002 cm³; l = 1 dm; $\alpha_D^{16} = +0,26^\circ \pm 0,02^\circ$

3,006 mg Subst. gaben 7,280 mg CO₂ und 2,130 mg H₂O (OAB)

C₂₇H₃₈O₈ (490,57) Ber. C 66,10 H 7,81% C 66,09 H 7,93%

Authentisches Strophanthidolacetat sowie die Mischprobe schmolzen gleich, auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ waren gleich.

Nigrescigenin. Aus Methanol-Äther farblose Körner, Smp. 238–241°. Aus Methanol-Wasser Körner mit Doppel-Smp. 162–168°/243–246°; $[\alpha]_D^{15} = +24,8^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,840 in Methanol).

8,37 mg Subst. zu 0,9970 cm³; l = 1 dm; $\alpha_D^{15} = +0,208^\circ \pm 0,02^\circ$

Gewichtsverlust bei Trocknung 9,46%; aschefrei.

2,315 mg Subst. gaben 5,545 mg CO₂ und 1,746 mg H₂O (A. P.)

6,342 mg Subst. verbr. 0,782 cm³ H₂ (727 Torr, 23,6°)

(Mikrohydrierung mit Pt in Eisessig (A. P.))

C₂₃H₃₂O₇ (420,49) Ber. C 65,69 H 7,68% Gef. C 65,36 H 8,44% D.Z. 2

Legal-Reaktion: positiv (rot); *Keller-Kiliani-Reaktion:* negativ; *Zuckerprüfung:* negativ. Tetranitromethan gab keine Färbung. Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄: orange, kastanienbraun (10°), braun mit violettem Rand (10'), blauviolett (20'), violett (40'), olivgrün (2 Std.). UV.-Absorptionsspektrum und biolog. Wirksamkeit siehe theoret. Teil. Der Stoff war leicht löslich in Methanol, schwerer in Chloroform und Aceton, schwer löslich in Äther und Wasser. Im Papierchromatogramm (Wasser: Butanol-Toluol (1:1)) zeigte er nur einen Fleck mit R_F = 0,41 (15°).

Nigrescigenin-diacetat. 97 mg Nigrescigenin vom Doppel-Smp. 162–168°/243–246° in 1,5 cm³ abs. Pyridin und 1 cm³ Acetanhydrid 2 Tage bei 20° stehengelassen gaben 128 mg rohes Acetat. Aus Methanol-Äther 93 mg farblose Plättchen, Smp. 198–201°; $[\alpha]_D^{17} = +21,1^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,0449 in Chloroform).

10,44 mg Subst. zu 1,0002 cm³; l = 1 dm; $\alpha_D^{17} = +0,22^\circ \pm 0,02^\circ$

Gewichtsverlust bei Trocknung 0,14%; aschefrei.

3,418 mg Subst. gaben 7,990 mg CO₂ und 2,158 mg H₂O (OAB)

4,303 mg Subst. gaben 10,129 mg CO₂ und 2,784 mg H₂O (A. P.)

C₂₇H₃₆O₉ (504,56) Ber. C 64,27 H 7,19%

C₂₉H₃₈O₁₀ (546,60) Ber. „ 63,72 „ 7,01%

Gef. „ 63,79; 64,24 „ 7,06; 7,24%

Im Papierchromatogramm (Formamid: Chloroform-Benzol (7:5)) war das Acetat einheitlich. Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄: blass orange, senfgelb (5'), dunkelbraun (15'), preussischblau (1 Std.), grüngelb verblasend (3 Std.). Der Stoff war leicht löslich in Aceton und Methanol, schwer in Äther und Wasser.

„*Nigrescigeninacetat-säure*“. 30 mg Nigrescigenin-acetat vom Smp. 198–201° in wenig Chloroform gelöst, im Vakuum eingedampft und Schaum bei 0,01 Torr und 50° getrocknet. In 1 cm³ Eisessig gelöst, portionsweise mit insgesamt 0,25 cm³ 2-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung (5 mg CrO₃) versetzt und 9 Std. bei 20° stehengelassen, worauf noch etwas CrO₃ nachweisbar war. Nach Zugabe von 5 Tropfen Methanol wurde noch 8 Std. stehengelassen. Dann im Vakuum eingedampft, in Chloroform-Äther (1:3) aufgenommen, mit verd. H₂SO₄ und Wasser gewaschen und viermal mit je 2 cm³ 2-n. Sodalösung ausgeschüttelt. Neutral Chloroform-Äther-Lösungen mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft, gaben 12 mg neutrales Oxydationsprodukt. Sodalösungen bei 0° mit verd. HCl bis zur eben kongosauren Reaktion versetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Mit Wasser gewaschene und über Na₂SO₄ getrocknete Chloroformauszüge gaben 21 mg rohe amorphe Säure.

Das Neutralprodukt gab aus Aceton-Äther 4 mg feine Nadeln, Smp. 191–202°; die Mischprobe mit Nigrescigenin-acetat schmolz bei 173–188°. Das Produkt war auch im Papierchromatogramm vom Ausgangsmaterial deutlich verschieden (vgl. Nr. 8 und 9 in Fig. 6).

Die Säure kristallisierte bisher nicht. Die 21 mg rohe Säure wurden in 0,5 cm³ Methanol bei 0° mit überschüssiger ätherischer Diazomethanlösung versetzt, 30 Min. bei 0° stehengelassen und eingedampft. Der Rückstand kristallisierte auch nach Chromatographie an Al₂O₃ bisher nicht.

Nigrescigenin-oxim. 30 mg Nigrescigenin in 1,5 cm³ abs. Alkohol mit der Lösung von 16 mg Hydroxylaminhydrochlorid und 59 mg krist. Na-Aacetat-trihydrat in 0,2 cm³ Wasser 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Im Vakuum eingedampft, mit 1 cm³ Wasser versetzt und viermal mit Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Die mit wenig Wasser gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 34 mg rohes Oxim, das bisher nicht kristallisierte.

Nigrescigenin-dibenzoat. 29 mg Nigrescigenin (bei 0,01 Torr und 50° getrocknet) in 0,7 cm³ abs. Pyridin bei 0° mit 0,15 cm³ reinstem Benzoylchlorid versetzt (färbt sich rosa) und 14 Std. unter H₂O-Ausschluss bei 20° stehengelassen. Dann mit 0,5 cm³ Methanol versetzt und noch 2 Std. stehengelassen. Übliche Aufarbeitung mit Chloroform-Äther (1:3) gab nach Trocknung bei 0,01 Torr und 50° 58 mg rohes, teilweise krist. Benzoat. Es wurde an 1,8 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Benzol-Chloroform (3:2) eluierten Anteile (35 mg) gaben aus Aceton-Äther-Petroläther 26 mg farblose Spiesse, Smp. 245–248°; $[\alpha]_D^{19} = +87,1^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,597 in Chloroform).

5,93 mg Subst. zu 0,9935 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{19} = +0,52^\circ \pm 0,02^\circ$

Trocknung (3 Std.) gab 0,27% Gewichtsverlust; aschefrei.

4,818 mg Subst. gaben 12,465 mg CO₂ und 2,794 mg H₂O (A. P.)

C₃₇H₄₀O₉ (628,69) Ber. C 70,68 H 6,41% Gef. C 70,60 H 6,49%

Die Substanz war leicht löslich in Aceton und Methanol, schwerer in Äther, fast unlöslich in Petroläther. Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄: orange (2'), karmin (20'). grün (1 Std.). Nach mehrwöchigem Liegen in geschlossenem Röhrchen zeigte dieses Präparat einen Smp. 263–266°.

Substanz E. Sche. 12. Aus Methanol-Äther-Petroläther farblose Spiesse, Smp. 232–234°, aus Methanol-Wasser rechteckige Plättchen mit Doppel-Smp. 190°/230–234°; $[\alpha]_D^{15} = +28,9^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,0015 in Chloroform).

9,95 mg Subst. zu 0,9935 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{15} = +0,29^\circ \pm 0,02^\circ$

Gewichtsverlust bei Trocknung 1,15%; aschefrei.

2,748 mg Subst. gaben 6,521 mg CO₂ und 1,886 mg H₂O (A. P.)

5,644 mg Subst. verbr. 3,18 cm³ 0,01-n. NaOH (Acetylbest.¹⁾) (S. W.)

C₂₅H₃₄O₈ (462,53) Ber. C 64,91 H 7,41 CH₃CO – 9,31%

C₂₇H₃₆O₉ (504,56) Ber. „ 64,27 „ 7,19 „ 17,06%

Gef. „ 64,76 „ 7,68 „ 22,27%

Legal-Reaktion: positiv (rot); *Zuckerprüfung:* negativ; *Tetranitromethan* gab keine Färbung. *UV.-Absorptionsspektrum* siehe theoret. Teil. Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄: zitronengelb (1'), orangefarbt (15'), karmin (20'), violett (45' bis 2 Std.), blassviolett (3 Std.). Das Präparat gab im Papierchromatogramm (Formamid: Chloroform-Benzol (5:7)) nur einen Fleck mit grösserer Laufgeschwindigkeit als Strophanthidin. Der Stoff war löslich in Aceton, schwerer in Methanol, schwer in Äther und Wasser.

Acetylierungsversuch. 28 mg Subst. E. Sche. 12 vom Doppel-Smp. 190°/230–234° mit 0,3 cm³ abs. Pyridin und 0,2 cm³ Acetanhydrid 2 Tage bei 20° stehengelassen. Aufarbeitung gab 29 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 26 mg Ausgangsmaterial, Smp. 231–234° (Mischprobe, Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄, Papierchromatogramm).

Dehydrierung mit CrO₃. 52 mg Subst. E. Sche. 12 mit Chloroform im Vakuum eingedampft und Schaum bei 0,01 Torr und 50° getrocknet. In 1 cm³ Eisessig portionsweise

¹⁾ Bestimmt nach der Methode von *K. Freudenberg & E. Weber*, Z. angew. Ch. **38**, 280 (1925), in der Ausführungsform von *E. Wiesenberger*, Mikrochemie **30**, 241 (1942).

mit $0,68 \text{ cm}^3$ 2-proz. CrO_3 -Eisessig-Lösung (13,6 mg CrO_3) versetzt und 12 Std. bei 20° stehengelassen, worauf noch CrO_3 nachweisbar war. Aufarbeitung wie bei „Nigrescigenin-acetat-säure“ gab 22 mg amorphen Neutralteil sowie 31 mg rohe Säure. Letztere gab aus Aceton-Äther 23 mg farblose Prismen, Smp. $214\text{--}218^\circ$. Diese wurden in Methanol bei 0° mit Diazomethan (in Äther) 15 Min. bei 0° behandelt. Der rohe Methylester wurde in Chloroform durch wenig Al_2O_3 filtriert. Aus Aceton-Äther 19 mg farblose Prismen. Smp. $245\text{--}247^\circ$; $[\alpha]_D^{15} = +46,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,049$ in Chloroform).

$10,49 \text{ mg}$ Subst. zu $1,0002 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ dm}$; $\alpha_D^{15} = +0,49^\circ \pm 0,02^\circ$

Trocknung (8 Std.) gab 1,0% Gewichtsverlust; aschefrei.

$3,843 \text{ mg}$ Subst. gaben $8,94 \text{ mg CO}_2$ und $2,44 \text{ mg H}_2\text{O}$ (S. W.)

$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_9$ (492,55) Ber. C 63,40 H 7,37% Gef. C 63,45 H 7,10%

Substanz E. Sche. 16. Aus Methanol-Äther farblose dünne Prismen, Smp. $236\text{--}239^\circ$; $[\alpha]_D^{17} = +54,8^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,8928$ in Chloroform).

$8,87 \text{ mg}$ Subst. zu $0,9935 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ dm}$; $\alpha_D^{17} = +0,489^\circ \pm 0,02^\circ$

$5,043 \text{ mg}$ Subst. gaben $12,200 \text{ mg CO}_2$ und $3,673 \text{ mg H}_2\text{O}$ (A. P.)

$\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (446,52) Ber. C 67,24 H 7,68%

$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (488,56) Ber. „ 66,37 „ 7,43%

$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_8$ (490,58) Ber. C 66,10 H 7,81% Gef. C 66,02 H 8,15%

Der Stoff war methoxylfrei. Legal-Reaktion: positiv (rot); Tetranitromethan gab keine Färbung. Farbreaktion mit konz. H_2SO_4 : gelb ($1'\text{--}60'$), grüngelb (1–2 Std.), grün (nach 2 Std.). Der Stoff war leicht löslich in Aceton, etwas schwerer in Methanol, schwer in Äther und Wasser. Das Präparat gab bei der Zuckerprobe leicht positive Reaktion und im Papierchromatogramm (Formamid:Chloroform-Benzol (5:7)) neben dem Hauptfleck noch einen schwachen Nebenfleck. Die beste Reinigung gelang durch Acetylierung.

Acetylierung. 19 mg des obigen Präparates mit $0,3 \text{ cm}^3$ abs. Pyridin und $0,2 \text{ cm}^3$ Acetanhydrid 2 Tage bei 17° stehengelassen. Aufarbeitung gab 19 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 17 mg farblose feine Prismen. Smp. $237\text{--}239^\circ$, Mischprobe mit Ausgangsprodukt ebenso, Drehung innerhalb der Fehlergrenze gleich. Dieses Präparat gab bei der Zuckerprüfung negative Reaktion und im Papierchromatogramm nur einen Fleck.

Trocknung (8 Std.; 3 Std.) gab 0,06%; 0,81% Gewichtsverlust; aschefrei.

$3,161 \text{ mg}$ Subst. gaben $7,73 \text{ mg CO}_2$ und $2,20 \text{ mg H}_2\text{O}$ (S. W.)

$3,663 \text{ mg}$ Subst. gaben $9,141 \text{ mg CO}_2$ und $2,679 \text{ mg H}_2\text{O}$ (A. P.)

$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (488,56) Ber. C 66,37 H 7,43% Gef. C 66,73; 68,03 H 7,78; 8,18%

Substanz E. Sche. 17. Aus Methanol-Äther feine, zu Drusen vereinigte Nadeln, Smp. $225\text{--}233^\circ$ (Zers.); $[\alpha]_D^{15} = -19,7^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,8586$ in Wasser); $[\alpha]_D^{15} = -34,5^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,8759$ in Methanol).

$8,53 \text{ mg}$ Subst. zu $0,9935 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ dm}$; $\alpha_D^{15} = -0,169^\circ \pm 0,02^\circ$

$8,76 \text{ mg}$ Subst. zu $1,0002 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ dm}$; $\alpha_D^{15} = -0,30^\circ \pm 0,02^\circ$

Gewichtsverlust bei Trocknung 1,65%; aschefrei.

$4,574 \text{ mg}$ Subst. gaben $10,300 \text{ mg CO}_2$ und $3,045 \text{ mg H}_2\text{O}$ (A. P.)

$\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_{11}$ (566,63) Ber. C 61,46 H 7,47% Gef. C 61,45 H 7,45%

Der Stoff war methoxylfrei. Legal-Reaktion: positiv; Zuckernachweis: positiv; Keller-Kilian-Reaktion: negativ; Tetranitromethan gab keine Färbung. Farbreaktion mit konz. H_2SO_4 : braun ($1'\text{--}60'$), braungrün (2 Std.), olivgrün (4 Std.). Der Stoff war leicht löslich in Wasser und Methanol, schwerer in Chloroform und Aceton, fast unlöslich in Äther. Im Papierchromatogramm (Wasser: Butanol-Toluol (1:1)) wurde nur ein Fleck mit $R_F = 0,26$ (15°) erhalten. UV.-Absorptionsspektrum siehe theoret. Teil.

Spaltversuch mit Takadiastase. 20 mg Subst. E. Sche. 17 in 7 cm^3 Wasser mit 50 mg Takadiastase und etwas Toluol 3 Tage bei 37° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 18,6 mg krist. Ausgangsmaterial, Smp. $224\text{--}228^\circ$. Misch-Smp. ebenso, im Papierchromatogramm gleiche Laufstrecken wie Ausgangsmaterial.

Acetat. 23 mg Subst. E. Sche. 17 vom Smp. 224—228° mit 0,5 cm³ abs. Pyridin und 0,3 cm³ Acetanhydrid 2 Tage bei 20° stehengelassen. Gab 34 mg Rohprodukt, das an 1,1 g Al₂O₃ chromatographiert wurde. Keine der Fraktionen kristallisierte bisher.

Die Mikroanalysen wurden in folgenden Laboratorien ausgeführt: Mikrolabor der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel (Leitung *E. Thommen*) (OAB), bei Herrn *A. Peisker*, Brugg (*A. P.*), bei Frau Dr. *M. Sobotka* und Herrn Dr. *E. Wiesenberger*, Graz (*S. W.*).

Zusammenfassung.

Extraktion des frischen Holzes von *Periploca nigrescens Afzel* mit Wasser und Alkohol lieferte nach üblicher Reinigung einen Extrakt, der reichliche Mengen digitaloider Glykoside, freier Aglykone und wahrscheinlich Aglykonacetate enthielt. Von den zuckerfreien Bestandteilen konnten neben reichlichen Mengen (ca. 0,14%) Strophanthidin etwas Strophanthidol sowie kleine Mengen von zwei weiteren Stoffen isoliert werden, die wir vorläufig als Substanz E. Sche. 12 und Substanz E. Sche. 16 bezeichnen. Diese stellen wahrscheinlich Aglykonacetate dar und besitzen möglicherweise die Formeln C₂₅H₃₄O₈ und C₂₅H₃₄O₇.

Die eigentlichen Glykoside stellten ein kompliziertes Gemisch wasserlöslicher Stoffe mit hoher biologischer Wirksamkeit dar, doch gelang es bisher nicht, daraus einheitliche krist. Bestandteile abzutrennen. Dieses Gemisch liess sich mit geeigneten Fermenten weitgehend abbauen, wobei teilweise Hydrolyse bis zur Aglykonstufe erfolgte. Der Hauptversuch wurde mit Strophanthobiase durchgeführt. In kristallisierter Form wurden dabei Strophanthidin, Strophanthidol sowie ein wahrscheinlich neues Aglykon C₂₃H₃₂O₇ isoliert, das wir Nigrescigenin nennen. Daneben wurden Spuren eines krist. Glykosides (Subst. E. Sche. 17) erhalten, dessen Analyse auf die Formel C₂₉H₄₂O₁₁ passte, das dem von *Uhle & Elderfield* beschriebenen Strophanthidin- β -D-glucosid ähnlich ist, aber von ihm verschieden zu sein scheint. Durch Chromatographie an Al₂O₃ liess sich aus dem fermentierten Material ferner ein amorphes, biologisch hochwirksames Glykosidgemisch (Konzentrat W) erhalten, das nach Papierchromatographie mindestens vier digitaloide Glykoside enthielt. Eine weitgehende Trennung dieser Komponenten liess sich durch Verteilungschromatographie erreichen, doch wurden bisher keine Kristalle erhalten. Konzentrat W liess sich mit Takadiastase teilweise weiter abbauen, wobei krist. Strophanthidin (ca. 12% der Theorie) erhalten werden konnte.

Die bisherigen Resultate, insbesondere der Abbau mit Fermenten, machen es wahrscheinlich, dass ein massgebender Anteil der hochwirksamen Glykoside in den Extrakten in Form von Derivaten des Strophanthidins, Strophanthidols und Nigrescigenins mit D-Glucose vorliegt. Strophanthidin- β -D-glucosid dürfte überwiegen und besonders im Konzentrat W angereichert gewesen sein.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.