

wechselnder Tri-ester-Konzentration zeigt, daß Tri-ester keinen Einfluß auf die Mono-ester-Hydrolyse, folglich keine Affinität zu den Phosphatasen haben.

Die wasserlöslichen Phosphorsäure-tri-ester des Methanols und Äthanols fallen in höherer Konzentration Erweiß, wodurch das Enzym teilweise inaktiviert und so eine Hemmung der Mono-ester-Hydrolyse vorgetäuscht wird.

III. Substrate und Enzymmaterial

1. Substrate: Tri-methyl-phosphorsäure-ester als $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{PO}$ (140.0) und Tri-äthyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$ (182.2), dargestellt nach einem Patent¹⁵. – Tri-*n*-propyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3\text{PO}$ (224.3) und Tri-iso-propyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3\text{PO}$ (224.3) und Tri-*n*-butyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_4\text{H}_9\text{O})_3\text{PO}$ (266.3) und Tri-isoamyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O})_3\text{PO}$ (308.4), dargestellt nach einem Patent¹⁶. – Tri-phenyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$ (326.3) und Tri-*o*-kresyl-phosphorsäure-ester als $(\text{CH}_3\cdot\text{C}_6\text{H}_4\text{O})_3\text{PO}$ (368.2) und Tri- β -naphthyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O})_3\text{PO}$ (482.2), dargestellt nach einem Patent¹⁷.

Die verwendeten Substrate waren praktisch frei von anorganischem Phosphat.

2. Enzymmaterial: Als Enzymlösungen, enthaltend „saure“ bzw. „alkalische“ Phosphatase, dienten Autolysate aus Schweineleber, Rinderleber und Schweineiere nach E. Bamann und E. Riedel¹⁸, Zubereitungen aus Kaninchenknochen nach M. Martland und R. Robison¹⁹, Preßsäfte aus Kartoffeln, Karotten, Spinatblättern und Auszüge aus „Luizym“, Luitpold-Werk, München. Die Durchführung der Versuche erfolgte nach den Angaben unserer I. Mitteilung¹.

221. Rudolf Tschesche und Günther Snatzke: Über pflanzliche Herzgifte, XXIX. Mittel.: Zur Konstitution des Ouabagenins¹

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

(Eingegangen am 15. Juni 1955)

Ouabagenin bildet leicht ein 1.5.19-Orthoformiat, in dem 2 freie Oxygruppen noch acetyliert und zum Keton oxydiert werden können. Die Reduktion des Diketons mit Natriumborhydrid liefert ein neues Diol, das nur ein Monoacetat ergibt. Es wird dargelegt, daß Ouabagenin sehr wahrscheinlich eine 11-Oxy-Verbindung ist und daß alle seine Hydroxyle außer dem an C¹¹ β -Konfiguration haben müssen. Für die Bildung des β -Ouabagenin-diacetates aus Aceton-ouabagenin über Diacetyl-aceton-ouabagenin wird angenommen, daß eine Umlagerung auf der Stufe vom Aceton-ouabagenin zu seinem Diacetyl-Derivat erfolgt.

Ouabagenin, mit seinen 6 Oxygruppen das sauerstoffreichste der bisher bekannten Cardenolide, ist zuerst durch das bequeme Hydrolysenverfahren von C. Mannich und G. Siewert²) zugänglich geworden. Diese Autoren

¹⁵) Dtsch. Reichs-Pat. Nr. 517 538 Kl. 120 v. 1. 7. 1927; I.G. Farbenindustrie A.-G., Frankfurt a. M.; C. 1931 I, 3057. – Dieser Ester wurde uns außerdem liebenswürdigerweise vom Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren herzlichen Dank aussprechen.

¹⁶) Dtsch. Reichs-Pat. Nr. 564 321 Kl. 120 v. 17. 11. 1932; I.G. Farbenindustrie A.-G., Frankfurt a. M.; C. 1933 I, 2172.

¹⁷) Amer. Pat. 1856 862 Serie 396 015 v. 3. 5. 1932, Dow Chemical Company; C. 1932 II, 924. ¹⁸) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 229, 125 [1934].

¹⁹) Biochem. J. 23, 237 [1929].

¹) XXVIII. Mittel.: R. Tschesche, M.-E. Rühnen u. G. Snatzke, Chem. Ber. 88, 686 [1955]. ²) Ber. dtsh. chem. Ges. 75, 737 [1942].

haben bereits die Stellung von fünf dieser OH-Gruppen in 1, 3, 5, 14 und 19 angenommen, während die 6. Oxygruppe an C-Atom 11 verlegt wurde. Diese Zuordnung erfolgte im wesentlichen auf Grund von Analogieschlüssen; in der letzten Zeit sind daher eine Reihe von Arbeiten erschienen, um diese Annahmen zu sichern³⁻¹⁰). Ihr Ergebnis kann man dahin zusammenfassen, daß sie die Verlegung der Oxygruppen an 1, 3, 5, 14 und 19 weiter stützen, doch bleibt die Position der 6. OH-Gruppe ungewiß. Wir haben uns seit längerer Zeit ebenfalls bemüht, diese Frage zu klären und vor allem auch Anhaltspunkte für die sterische Anordnung dieser Gruppen zu finden.

Bei unseren Untersuchungen sind wir von der Überlegung ausgegangen, daß es notwendig ist, ein Verfahren zu finden, das gestattet, möglichst mehrere OH-Gruppen gleichzeitig zu blockieren, um dann an den verbleibenden Hydroxylen selektive Umsetzungen vornehmen zu können. Dazu schien uns die Aceton-Verbindung des Ouabagenins, die seit Mannich und Siewert^{2, 5)} bekannt ist, als nicht sehr geeignet, da der Acetonrest relativ leicht wieder abgespalten wird. Die neue Arbeit von Ch. Tamm⁸⁾ zeigt denn auch die Unbeständigkeit dieses Schutzes, worin wohl auch die Ursache zu suchen ist, daß es bisher nicht möglich war, den Unterschied der beiden isomeren α - und β -Ouabagenin-diacetate eindeutig zu klären.

Der gleichzeitige Verschluß von 3 Oxygruppen gelang uns durch Umsetzung des Ouabagenins (I) mit Orthoameisensäure-äthylester in methanolischer Salzsäure; bereits während des Auflösens trat eine dichte Abscheidung von stäbchenförmigen Kristallen eines cyclischen Orthoformiats (III) ein.

Zur Konstitution dieses Kondensationsproduktes zwischen Ouabagenin und Orthoameisensäure lassen sich folgende Überlegungen anstellen: Wird angenommen, daß 3 Oxygruppen im Ring A des Ouabagenins (Ia) *cis*-ständig zueinander angeordnet sind, so müßte sich eine ähnliche 2.4.10-Trioxa-adamantan-Verbindung (II) herstellen lassen, wie sie kürzlich von H. Stetter und K. H. Steinacker¹¹⁾ durch Umsetzung von *cis*-Phloroglucit mit Orthoameisensäure-ester erhalten wurde. Andererseits ist es aber ebenso möglich, daß nicht die Hydroxyle 1, 3 und 5, sondern 1, 5 und 19 des Ouabagenins unter Bildung eines 2.6.7-Trioxa-bicyclo-[2.2.2]-octan-Systems herangezogen werden (III, IIIa). Ein Vertreter dieses Verbindungstypus ist z. B. der *p*-Nitrobenzoyl-ester des 1-*p*-Nitrophenyl-4-oxymethyl-2.6.7-trioxa-bicyclo-[2.2.2]-octans von E. D. Bergmann, E. Bograchov und S. Pinchas¹²⁾. Über Orthoacetate ähnlicher Art wird auch von einigen Steranalkaloiden berichtet¹³⁾.

³⁾ A. Meyrat u. T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **31**, 2104 [1948].

⁴⁾ R. F. Raffa u. T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **31**, 2111 [1948].

⁵⁾ R. P. A. Sneeden u. R. B. Turner, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 3510 [1953].

⁶⁾ K. Florey u. M. Ehrenstein, *J. org. Chemistry* **19**, 1174 [1954].

⁷⁾ C. Djerassi u. R. Ehrlich, *J. org. Chemistry* **19**, 1351 [1954].

⁸⁾ Ch. Tamm, *Helv. chim. Acta* **38**, 147 [1955].

⁹⁾ R. P. A. Sneeden u. R. B. Turner, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 130 [1955].

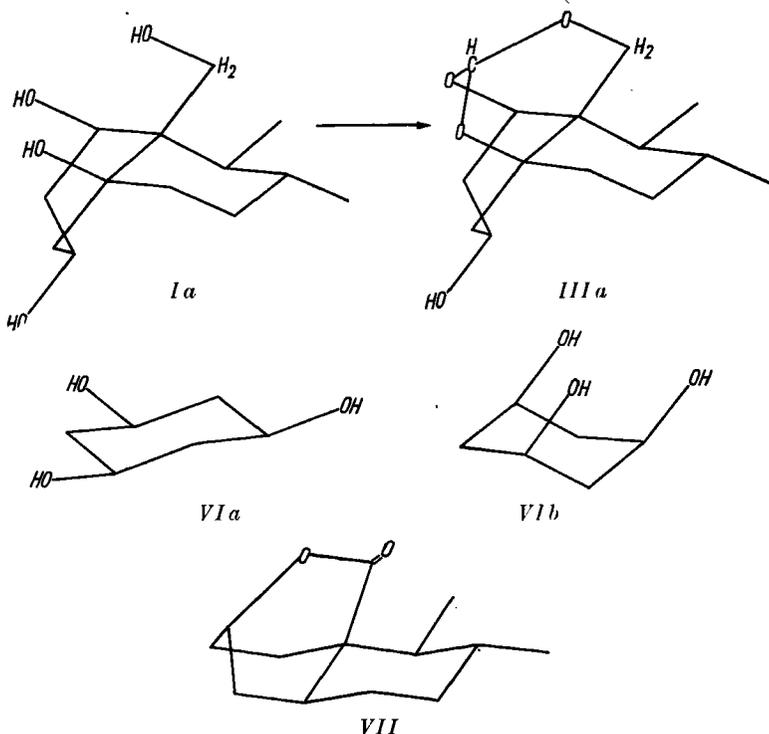
¹⁰⁾ R. Tschesche u. R. Petersen, *Chem. Ber.* **86**, 574 [1953].

¹¹⁾ *Chem. Ber.* **86**, 790 [1953].

¹²⁾ *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 2352 [1951].

¹³⁾ a) A. Stoll u. E. Seebeck, *Helv. chim. Acta* **37**, 824 [1954]. b) S. M. Kupchan, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 686 [1955].

Die Übertragung der Kondensationsreaktion mit Orthoameisensäure-ester auf Ouabain selbst ergibt laut Papierchromatogramm Ouabain, Ouabagenin sowie das cyclische Orthoformiat III, ein vierter Fleck muß dem cyclischen Orthoformiat des Ouabains (V) zukommen. Diese Annahme kann noch durch die Berechnung des R_M -Wertes nach E. R. Reichle¹⁵⁾ gestützt werden. Die R_M -Werte (in Butanol-Pyridin-Wasser) sind für Ouabagenin + 0.23, für das cyclische Orthoformiat (III) des Ouabagenins + 0.45, während Ouabain und sein Orthoformiat die Werte -0.12 bzw. +0.09 haben. Der berechnete Wert für die letztere Verbindung würde sich zu + 0.10 ergeben. Verwendet man für die Kondensation wasserfreies Ouabain und Zinkchlorid in Methanol, so entsteht allein der vierte Fleck des cyclischen Orthoformiats des Glykosids (V).



Die Formeln I a, III a, VI a, VI b und VII stellen schief axonometrische Bilder der Atomschwerpunkte und deren Verbindungslinien dar

Sterische Überlegungen führen zur gleichen Formulierung der Orthoformiate. Der *cis*-Phloroglucit (VI a, b) liegt frei sicher in tris-äquatorialer Form vor, da einfache 1.3.5-tris-axial substituierte Cyclohexane nicht bekannt sind¹⁶⁾. Bei der Überführung in das 2.4.10-Trioxa-adamantan muß somit ein Umklappen erfolgen. Im Ouabagenin ist eine tris-äquatoriale Anordnung der

¹⁵⁾ Mh. Chem. 86, 69 [1955].

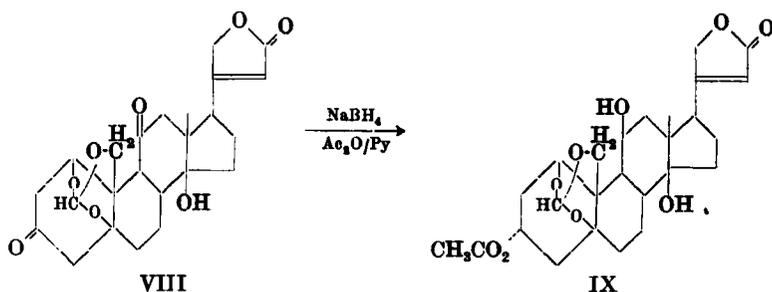
¹⁶⁾ W. Klyne, Progress in stereochemistry I, S. 51; Butterworths Scientific publications, London 1954.

1(β).3(β).5(β)-Oxy-Gruppen wegen der Kondensation des Ringes A an die Ringe B und C unmöglich. Infolge der starken Abstoßung der Oxygruppen in 1.3-Stellung liegt daher der Ring A im Ouabagenin wohl vornehmlich in der Bootform (Ia) vor. Solche Bootformen sind dann besonders stabil, wenn durch Brückenschlag die C-Atome 1 und 4 des Cyclohexanringes einander genähert sind, wie z. B. im Uzarigeninsäure-(19)-lacton-(19 \rightarrow 3) (VII). Auch die 3 Ringe, die das Bicyclo-octan-System (IIIa) bilden, müssen Bootform haben.

Bei der Bildung des Systems II aus der Bootform Ia müßte ein Umklappen in die Sesselform erfolgen, für die des Systems III ist dies nicht notwendig, da die 3 Oxygruppen an C³, C⁵ und C¹⁹ schon in einer sterisch begünstigten Anordnung vorliegen.

Das cyclische Orthoformiat III setzt der Hydrolyse viel stärkeren Widerstand entgegen als das 2.4.10-Trioxa-adamantan von Stetter¹¹). Wäßrige n_{10} H₂SO₄, 50-proz. Essigsäure und Eisessig sind bei Zimmertemperatur ohne Einwirkung. Bei längerem Erwärmen auf dem Wasserbad tritt allmähliche Spaltung ein. Papierchromatographisch läßt sich nachweisen, daß dabei ein Gemisch von Ouabagenin und verschiedenen seiner Dehydratisierungsprodukte entsteht. Auch die von A. Stoll und E. Seebeck^{13a}) empfohlene Hydrolyse mit verd. Phosphorsäure liefert das gleiche Ergebnis.

Von *N*-Bromsuccinimid wird III in wäßrigem Dioxan (50-proz.) nicht angegriffen. Hiermit steht die Feststellung von L. F. Fieser und S. Rajagopalan¹⁷) in Einklang, daß OH-Gruppen in 3- und 12(α)-Stellung unter diesen Bedingungen nicht dehydriert werden, gleichzeitig werden dadurch die Positionen 6 und 7(α) nochmals ausgeschaltet. Der Versuch der Oxydation mit dem gleichen Oxydationsmittel in *tert.* Butanol scheitert an der zu geringen Löslichkeit der Substanz in diesem Lösungsmittel. Chromtrioxyd in Eisessig erweist sich als wenig geeignet, da die entstehenden Ketone durch die Säure zum Teil



sehr schnell unter Bildung sehr wasserlöslicher Derivate weiter verändert werden, wie das Auftreten mehrerer Flecke im Papierchromatogramm zeigt. Besser bewährt sich die elegante Methode von Poos und Mitarbb.¹⁴), die außer der Vermeidung des sauren Milieus noch einen weiteren Vorteil bietet. Nach üblicher Vorreinigung durch Ausschütteln mit Chloroform läßt sich das allein entstehende Diketon VIII leicht zur Kristallisation bringen, ohne daß eine Chromatographie notwendig wird. Dadurch werden mögliche Sekundärreaktionen an Aluminiumoxyd^{6, 8}) ausgeschlossen. Saure Bestandteile entstehen

¹⁷) J. Amer. chem. Soc. 71, 3938 [1949]; 72, 5530 [1950].

bei dieser Reaktion nicht, ein geringer in die Natriumcarbonatlösung übergegangener Anteil erweist sich nach papierchromatographischen Untersuchungen ebenfalls als Diketon VIII und ist durch die Wasserlöslichkeit der Verbindung bedingt.

Kurzes Aufkochen in Eisessig läßt das Diketon unverändert. Dieser Befund schließt die Möglichkeit aus, daß eine der Ketogruppen die Stellung 15 einnimmt. Eine 14-Oxy-15-keto-Verbindung würde sicherlich unter den gewählten Bedingungen die Oxygruppe an C¹⁴ als Wasser verlieren.

Bei dem Versuch, auf die übliche Art (in Methanol/Wasser mit Natriumacetat) ein Oxim darzustellen, wird das Trioxa-bicyclo-octan-Gerüst anscheinend tiefgreifend verändert, da sich im Reaktionsansatz papierchromatographisch nicht weniger als sechs Substanzen nachweisen lassen*). Umsetzung mit Hydroxylamin in Pyridin/Äthanol ergibt dagegen eine einzige, schön kristallisierende Verbindung, die nach der Analyse zwei Stickstoffatome enthält. Sowohl 11- als auch 12-Keto-Gruppen werden jedoch in der Cardenolidreihe nicht oximiert. Die auffällige Aufnahme eines 2. N-Atoms in die Molekel dürfte jedoch auf einer Umsetzung mit dem cyclischen Orthoformiat-System beruhen, da Orthoameisensäureester unter den gleichen Bedingungen mit Hydroxylamin ebenfalls reagieren.

Das UV-Spektrum des Diketons VIII hat die übliche Form eines Keto-cardenolids mit $\lambda_{\max} = 218 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4.23$) und $\lambda_{\max} = 293 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 1.85$), während das langwellige Maximum im Sarmentogenon bei $294 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 1.74$) und im Digoxigenon bei $285 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 1.82$) liegt. Das entspricht den Angaben von O. Schindler und T. Reichstein¹⁸⁾, wonach die Ketobande in 11-Oxo-Derivaten um 10–15 $\text{m}\mu$ langwelliger liegt als in 12-Oxo-Verbindungen.

Das Diketon VIII wird von Chromtrioxyd in Eisessig nur langsam unter Abspaltung der Formiatgruppe angegriffen; eine Aldehydgruppe ist demnach nicht vorhanden.

Die Reduktion des Diketons VIII mit Natriumborhydrid in 80-proz. Dioxan^{19), 20)} ergibt zwei Triole, die jedoch wegen der Anwesenheit schwer zu entfernenden Bors nicht kristallisiert werden konnten. Abspaltung mit Mannit und $n/_{10} \text{H}_2\text{SO}_4$ verbot sich wegen der Wahrscheinlichkeit eintretender Hydrolyse. Dagegen läßt sich aus dem Triolgemisch leicht ein reines, kristallines Acetat IX gewinnen.

Nach der Analyse handelt es sich hier um ein Monoacetat**), während im ursprünglichen cyclischen Orthoformiat beide Oxygruppen veresterbar sind. Auf dem Umweg über das Dehydrierungsprodukt VIII ist also mindestens ein Hydroxyl so epimerisiert worden, daß es nun sterisch gehindert ist und von Pyridin/Acetanhydrid nicht mehr angegriffen wird. Ein solches Verhalten ist bei den hier in Frage kommenden Hydroxylen nur von der 11 β -Oxy-Gruppe²⁰⁾ bekannt. Die 6. Oxygruppe nimmt daher im Ouabagenin die Stel-

*) Anm. b. d. Korr.: Inzwischen ließ sich auch hierbei die gleiche Verbindung wie bei der Reaktion in Pyridin/Äthanol kristallisieren.

¹⁸⁾ Helv. chim. Acta **37**, 667 [1954].

¹⁹⁾ H. P. Sigg, Ch. Tamm u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta **38**, 166 [1955].

²⁰⁾ O. Schindler, Helv. chim. Acta **38**, 538 [1955].

**) Dieses Monoacetat läßt sich mit Pyridin/Chromsäure zur entsprechenden 11-Dehydro-Verbindung oxydieren, Schmp. 232–240°, R_F -Wert in Pentanol/Wasser 0.45.

lung 11 ein unter der sehr wahrscheinlichen Voraussetzung des gleichen Ringsystems wie in den anderen Cardenoliden; die von Mannich²⁾ bereits vor 13 Jahren vermutete Formel wird so vollauf bestätigt, und auch neuerdings vorgenommene Aromatisierungen⁹⁾ lassen sich in befriedigender Weise deuten.

Sowohl in der C/D-*cis*- wie -*trans*-Reihe lassen sich die 11 α -, 12 α - und 12 β -Oxy-Gruppen unter milden Bedingungen verestern. Bei Herzgiften ist das für reine 12 α -Oxy-cardenolide noch nicht erwiesen, Cudogenin und Inertogenin mit einer vermuteten 11-Keto-12 α -oxy-Gruppierung werden aber ebenfalls leicht acetyliert²¹⁾. Die 11 β -Oxy-Gruppe im 11-Epi-sarmentogenin und 11-Epi-sarnovid ist nach O. Schindler²⁰⁾ unter diesen Bedingungen nicht acetylierbar.

Die Konfiguration der beiden Oxygruppen im Reduktionsprodukt folgt auf Grund der bekannten Regeln über die Konformation der bei der NaBH₄-Reduktion entstehenden Alkohole. Ungehinderte Ketone geben dabei vorwiegend äquatorial angeordnete Oxygruppen, sterisch gehinderte dagegen axiale Substitution. Für die 3- und 11-Keto-Gruppen ist dies oftmals nachgewiesen worden^{19,20)}, und es liegt somit mit größter Wahrscheinlichkeit in IX ein 3 α -Acetoxy-11 β -ol vor.

Nach der Acetylierung läßt sich in der Mutterlauge papierchromatographisch neben großen Mengen des gesuchten Produktes IX noch wenig nicht reduziertes Diketon VIII nachweisen, ferner tritt ein weiterer Fleck geringer Intensität bei 0.64 (Pentanol-Wasser) auf, bei dem es sich um das 3 β .11 β -Epimere handeln muß, da nach dem R_F -Wert ein Diacetat kaum in Frage kommt.

Tafel 1. Molekularrotationen von Cardenoliden und ihren Derivaten

Substanz	Lösgm.	M_D
Sarmentogenin	Äthanol	+86°
Sarmentogenin-diacetat	Chlf.	+43°
Sarmentogenon	Chlf.	+54°
11-Epi-sarmentogenin-acetat-(3)	Chlf.	+108°
Digitoxigenin-acetat	Chlf.	+79°
3-Epi-digitoxigenin-acetat	Chlf.	+175°
Digoxigenin	Chlf.	+78°
Digoxigenin-diacetat	Chlf.	+232°
Digoxigenon	Chlf.	+502°
Ouabagenin-orthoformiat-(1.5.19) (III)	Py.	+91°
Ouabagenin-orthoformiat-(1.5.19)-diacetat-(3.11) (IV)	Py.	+24°
3.11-Dehydro-ouabagenin-orthoformiat-(1.5.19) (VIII)	Py.	+111°
1 β .3 α .5 β .11 β .14 β .19-Hexaoxy-cardenolid-acetat-(3)-orthoformiat-(1.5.19) (IX)	Py.	+144°

Tafel 2. Analyse der Molekularrotationen

ΔM (3 β -OH, 11 α -OH \rightarrow 3 β -OAc, 11 α -OAc) = -43°	ΔM (III \rightarrow IV) = -67°
ΔM (3 β -OH, 12 β -OH \rightarrow 3 β -OAc, 12 β -OAc) = +154°	
ΔM (3 β -OAc, 11 α -OAc \rightarrow 3 α -OAc, 11 β -OH) = +161°	ΔM (IV \rightarrow IX) = +120°
ΔM (3 β -OH, 11 α -OH \rightarrow 3-C=O, 11-C=O) = -32°	ΔM (III \rightarrow VIII) = + 20°
ΔM (3 β -OH, 12 β -OH \rightarrow 3-C=O, 12-C=O) = +424°	

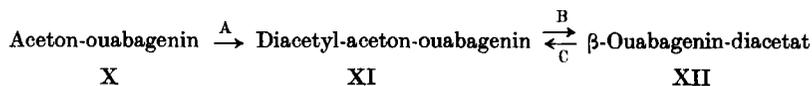
²¹⁾ H. Hegedüs, Ch. Tamm u. T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **38**, 98 [1955].

Damit ist für Ouabagenin nicht nur die Stellung der Oxygruppen zu 1, 3, 5, 11, 14 und 19 bestimmt, es kann auch mit Sicherheit die Konfiguration derselben angegeben werden. Die in 1 und 5 müssen β -ständig sein, da sonst die Bildung eines cyclischen Orthoformiats unmöglich wäre. Das Hydroxyl am C¹¹ kann nur die α -Konfiguration haben, da es sonst nicht acetylierbar wäre, und für das an C¹⁴ ist wegen der Existenz einer Isoverbindung wie in allen Cardenoliden die β -Ständigkeit erwiesen. Lediglich für die Oxygruppe an C⁸ gibt es keinen chemischen Konfigurationsbeweis, die beträchtliche cardiotonische Wirkung spricht aber sehr für 3β , da (in der A/B-*cis*-Reihe) Epi-digitoxigenin und 3-Epi-tanghinigenin physiologisch inaktiv sind¹⁹).

Die Analyse der Molekularrotationen steht mit diesen Ergebnissen in qualitativ guter Übereinstimmung, obwohl einerseits die cyclische Orthoformiat-Gruppierung beträchtliche Vicinalwirkung zumindest auf das Zentrum C⁸ ausüben wird und ferner die der Literatur entnommenen Drehungen meist in Chloroform und Äthanol gemessen wurden, während wir wegen der guten Löslichkeit für alle dargestellten Derivate Pyridin verwendet haben.

Die Werte für eine 3.12-Gruppierung sind, soweit bekannt, mit berücksichtigt. Aus der Tafel 2 geht ebenfalls hervor, daß eine 12 β -Oxy-Gruppe im Ouabagenin sehr unwahrscheinlich ist.

Tamm⁸) hat in seiner ausführlichen Arbeit über die Struktur des Acetonouabagenins die Isopropyliden-Gruppierung zwischen C¹ und C¹⁹ angenommen, während frühere Autoren die Formulierung einer 1.3-Brücke vorzogen, allerdings ohne Beweise dafür zu haben. Im β -Ouabagenin-diacetat sollen aber die beiden Acetyle die Positionen 3 und 19 einnehmen, in der Reaktionsfolge



nimmt Tamm daher beim Schritt B eine Umlagerung an. Da aber diese Reaktion auch in der umgekehrten Richtung möglich ist⁵), so müßte der Schritt C wieder unter Umlagerung erfolgen. Thermodynamisch ist dies aber wenig wahrscheinlich, da die treibende Kraft der Umlagerung B gerade die Wanderung der Acetyle aus einer labilen in eine stabilere Lage sein dürfte. Wir sind daher eher der Ansicht, daß bei der Acetylierung von Acetonouabagenin (Schritt A) die Umlagerung erfolgt und möchten die verschiedene Stabilität der Isopropyliden-Verbindungen X und XI bei der Hydrolyse als Beweis hierfür ansehen. Man kann papierchromatographisch leicht zeigen (vergl. Versuchsteil), daß XI leichter hydrolysierbar ist als X.

Für Acetonouabagenin möchten auch wir die Tammsche Formel mit der Brücke von 1 nach 19 als richtig annehmen, eine solche zwischen 1 und 5 läßt sich aber vorerst nicht ganz ausschließen. Die Formulierung des Acetonids als 1.19-Verbindung läßt vermuten, daß seine Bildung genau so wie bei der Darstellung des cyclischen Orthoformiats-(1.5.19) mit Hilfe methanolischer Salzsäure möglich ist. Tatsächlich ist das Acetonid auch auf diese Weise aus Ouabagenin leicht darstellbar. Auch die Rückführung des β -Ouabagenindiacetates in seine Aceton-Verbindung (XI) gelingt so, allerdings geht die Reak-

Ouabagenin-orthoformiat-(1.5.19) (III): 1.98 g Ouabagenin (aus Nitrobenzol oder Äthanol umkrist.) wurden mit 84 ccm 0.54-proz. methanol. Salzsäure unter Rühren mit 5.0 ccm Orthoameisensäure-äthylester versetzt. Dabei trat oft bereits während des Lösens eine kristalline Fällung des Orthoformiats auf (0.74 g). Durch Einengen der Lösung konnten nochmals 0.63 g krist. Material gewonnen werden. Beim völligen Eindampfen der Mutterlauge entstand ein gelblicher Schaum, aus dem beim Umkristallisieren noch eine weitere Menge Kristalle erhalten werden konnten. Eine geringe gelbliche Verunreinigung ließ sich mit Methanol leicht auswaschen. Eine Entfernung der Säure vor dem Eindampfen bot keine Vorteile, eine Fällung mit Äther/Petroläther lieferte das gleiche Material.

Die Verbindung ist gut löslich in Methanol, Äthanol sowie in Pyridin, mit Wasser läßt sie sich aus diesen Lösungsmitteln nicht ausfällen. Mäßig ist die Löslichkeit in Aceton und Dioxan. Aus Pyridin/Äther/Petroläther oder Dioxan/Petroläther wurden dicke, oft zu Drusen vereinigte Prismen vom Schmp. 286–290° und aus Aceton/Petroläther dicke, stumpf abgeschrägte, kleine Säulen vom Schmp. 293–304° erhalten.

$[\alpha]_D^{20}$: +20.2° ± 2° (Pyridin, $c = 1.187$).

$C_{24}H_{32}O_8$ (448.5) Ber. C 64.27 H 7.19 Gef. C 63.98 H 7.11

Es ist nicht notwendig, aus Nitrobenzol umkristallisiertes Ouabagenin zu verwenden, gleich gute Ergebnisse erhält man auch mit solchem, das nach der Spaltung des Acetonids durch Einengen der alkoholischen Lösung zu erhalten ist.

An Stelle der methanol. Salzsäure konnte auch ein Methanol verwendet werden, in das eine geringe Menge Bortrifluorid geleitet worden war. Größere Mengen davon sowie von Chlorwasserstoff sind zu vermeiden, da sie Anlaß zur Bildung von Dehydratisierungsprodukten geben.

Diacetat des Ouabagenin-orthoformiats-(1.5.19) (IV): 184 mg Ouabagenin-orthoformiat (III) wurden in 10 ccm Pyridin und 1.2 ccm Acetanhydrid 2 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung ergab 272 mg Rohprodukt, das in 3 ccm Chloroform/2 ccm Äther gelöst wurde; die Lösung mit Petroläther bis zur Trübung versetzt, lieferte 172 mg Kristalle vom Schmp. 175–181°. Eine nochmalige Kristallisation aus Chloroform/Petroläther ergab tetraederartige Kristalle, oft zu kugeligen Aggregaten vereinigt, die bei 184–185° schmolzen, dann wieder fest wurden, um endgültig bei 230–231° zu schmelzen.

$[\alpha]_D^{20}$: +4.5° ± 2° (Pyridin, $c = 0.878$).

$C_{28}H_{36}O_{10}$ (532.6) Ber. C 63.14 H 6.81 CH_3CO 16.10
Gef. C 63.20 H 6.90 CH_3CO 16.41

3.11-Dehydro-ouabagenin-orthoformiat-(1.5.19) (VIII):

a) mit Chromtrioxyd in Pyridin: 2.27 g Orthoformiat des Ouabagenins (III), in 50 ccm Pyridin gelöst, wurden mit einer Suspension von 2.02 g Chromtrioxyd in 35 ccm Pyridin versetzt, worauf der Chromsäure/Pyridin-Komplex sofort in Lösung ging und nach etwa 10–15 Min. eine dichte Abscheidung brauner, amorpher Flocken begann. Nach 24 Stdn. wurde mit 100 g Eis versetzt und nach Zugabe von 5 ccm Methanol nochmals 24 Stdn. stehengelassen. Anschließend wurde sechsmal mit 150 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Lösung wurde filtriert, um braune Flocken zu entfernen und mit möglichst wenig $2nH_2SO_4$, eiskalter $2nNa_2CO_3$ und schließlich mit Wasser gewaschen. Die Chloroform-Lösung hinterließ nach dem Trocknen und Eindampfen 2.66 g eines braunen Schaumes. Er wurde mit wenig Dioxan ausgekocht, wobei ein beträchtlicher Rückstand blieb. Dieser wurde im Soxhlet-Apparat mit Dioxan extrahiert. Es entstand eine leicht gelbliche Lösung, die nach dem Versetzen mit Petroläther 586 mg schwach grünlich gefärbte Kristalle lieferte. Aus der Mutterlauge konnte beim Eindampfen, ebenso aus dem ersten Dioxan-Auszug mit Petroläther, weiteres kristallisiertes Material gewonnen werden. Beim Umkristallisieren aus Dioxan/Petroläther wurden dünne Stäbchen erhalten, die meist zu Büscheln vereinigt waren, vom Schmp. 257–258°. Aus Pyridin/Äther/Petroläther entstanden flache breite Blättchen von einem unscharfen Schmp. von 256–280°.

Als besonders brauchbares Lösungsmittel zum Umkristallisieren und vor allem zum Anreiben erwies sich Acetonitril, das allein oder auf Zusatz von Äther/Petroläther sechseckige Prismen vom Schmp. 270–272°, nach Sintern bei 260°, lieferte. Aus Methanol/Äther/Petroläther Sternchen dünner Stäbchen vom Schmp. 271–272°.

$[\alpha]_D^{18}$: +24.9° ± 3° (Pyridin).

$C_{24}H_{28}O_8$ (444.5) Ber. C 64.85 H 6.50 Gef. C 64.66 H 6.32

b) mit Chromtrioxyd in Eisessig: 224 mg Ouabagenin-orthoformiat-(1.5.19) wurden in 14 ccm gegen CrO_3 beständigem Eisessig gelöst und innerhalb 1 Stde. portionsweise mit insgesamt 5.6 ccm einer 2-proz. Chromtrioxyd-Lösung in Eisessig versetzt. Nach einer weiteren Stunde fügte man 2 ccm Methanol zu und brachte nach 2stdg. Stehenlassen i. Vak. zur Trockne (weißer Schaum, 103 mg). Nach Lösen in Methanol wurde wieder eingedampft, in Chloroform aufgenommen und mit wenig 2 *n* H_2SO_4 , 2 *n* Na_2CO_3 und Wasser ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde eingedampft und dann aus Dioxan/Petroläther umkristallisiert. Es resultierten 18.4 mg rohe Kristalle, die sich nach weiterer Reinigung mit dem nach a) dargestellten Produkt identisch erwiesen. Im sauren und natriumcarbonatalkalischen Waschwasser findet sich im wesentlichen dasselbe Produkt, im letzten Waschwasser dagegen tritt vor allem eine Substanz mit größerem R_F -Wert (Pentanol-Wasser) auf, die bisher nicht kristallisiert werden konnte.

Dioxim (?) von VIII: 50 mg des 3.11-Dehydro-ouabagenin-orthoformiats-(1.5.19) wurden mit 79 mg Hydroxylamin-hydrochlorid in 1 ccm Pyridin und 1.5 ccm Äthanol 1 Stde. auf dem Wasserbad erwärmt. Danach wurde die Lösung zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgekocht und das Ungelöste abfiltriert. Dieses Material (42 mg) wurde aus Pyridin unter Zusatz von Äther/Petroläther umkristallisiert und zu Büscheln vereinigte lange Nadeln erhalten, die bei 302–303° schmolzen. Sie sind praktisch unlöslich in Wasser und den meisten organ. Lösungsmitteln außer Pyridin und Morpholin. Eine geringe Löslichkeit besteht auch in Dioxan.

$[\alpha]_D^{25}$: -72.0° ± 2° (Pyridin, $c = 1.000$).

$C_{24}H_{30}O_8N_2$ (474.5) Ber. C 60.75 H 6.37 N 5.90 Gef. C 60.80 H 6.75 N 5.84

1(β).3(α).5(β).11(β).14(β).19-Hexaoxy-cardenolid-acetat-(3)-orthoformiat-(1.5.19) (IX): 132 mg 3.11-Dehydro-ouabagenin-orthoformiat-(1.5.19) wurden in 20 ccm 80-proz. Dioxan gelöst und mit 84 mg Natriumborhydrid in 10 ccm 80-proz. Dioxan versetzt. Nach 14stdg. Aufbewahren bei Zimmertemperatur wurde auf 0° gekühlt und die Lösung mit 2 *n* H_2SO_4 auf p_H 2 gebracht. Dann wurde das Dioxan i. Vak. unter gleichzeitigem Zutropfen von 60 ccm Wasser entfernt und die verbleibende Lösung auf ein kleines Volumen eingengt. Anschließend wurde sie mit je 80 ccm Chloroform fünfmal ausgeschüttelt, die Chloroform-Lösung in der üblichen Weise gewaschen und eingedampft. Es hinterblieben 122 mg Rohprodukt. Sie wurden mit 5 ccm Pyridin und 1.5 ccm Acetanhydrid zunächst 1 Stde. auf dem Wasserbad erhitzt und das Gemisch dann noch 2 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung ergab 111 mg, die beim Umkristallisieren aus Methylenchlorid/Petroläther 48 mg Drusen lieferten. Methylenchlorid ergab dichte Büschel feinsten Nadelchen vom Schmp. 171–174°. Aus der Mutterlauge konnte mit Petroläther eine weitere kleine Menge Kristalle gewonnen werden. Dagegen konnten aus Chloroform oder Chloroform/Petroläther nur amorphe Abscheidungen erzielt werden.

$[\alpha]_D^{25}$: +27.1° ± 2° (Pyridin, $c = 0.664$).

Fein zerrieben schmilzt das Acetat bei 166–170°, gemischt mit dem Acetat IV vom Schmp. 175–178°/230–231° ergab sich ein Misch-Schmp. von 162–170°.

$C_{26}H_{34}O_9$ (490.5) Ber. C 63.65 H 6.99 CH_3CO 8.77 Gef. C 63.94 H 7.13 CH_3CO 9.47

Ouabagenin-acetonid (X): 55 mg Ouabagenin (aus Nitrobenzol umkristallisiert) wurden unter Rühren in 2.5 ccm 0.54-proz. methanol. Salzsäure mit 0.4 ccm Aceton versetzt. Nach 15 Min. wurde die bald aufgetretene amorphe Abscheidung abfiltriert (46 mg) und aus Nitrobenzol oder Dimethylformamid umkristallisiert. Schmp. 297 bis 300°.

Ouabagenin-acetonid-diacetat (XI): 33 mg β-Ouabagenin-diacetat wurden mit 2.5 ccm 0.54-proz. methanol. Salzsäure und 0.4 ccm Aceton bei Zimmertemperatur

stehengelassen. Nach einigen Stunden hatte sich erst ein geringer Teil umgesetzt, nach 4 Tagen war aber nur mehr Acetonid nachweisbar. Die Lösung wurde darauf mit Amberlite IRA 410 durch Schütteln entsäuert und anschließend i. Vak. zur Trockne eingedampft. Aus Aceton/Petroläther wurden wenige Kristalle erhalten, die bei 261° schmolzen. Die schlechte Ausbeute scheint durch die Adsorption an den Ionenaustauscher bedingt zu sein.

Zur Verseifung nach Sneed und Turner⁵⁾ löst man XI bzw. X in heißem Eisessig ($t = 0$ Min.) und trägt sofort einen Tropfen auf einen Papierstreifen auf ($t = 1$ Min.), verdünnt kalt mit der gleichen Menge Wasser ($t = 3.5$ Min.), trägt nach 5 Min. nochmals einen Tropfen auf und entwickelt. Das Papierchromatogramm zeigt im ersten Fall etwa 5–10% der Verbindung XII neben unverändertem XI an, aber bereits nach 5 Min. sind nur mehr 5% Acetonid vorhanden, während der Rest hydrolysiert ist. Die Mengen wurden aus der Intensität der Farbflecke im Papierchromatogramm nach dem Einsprühen mit dem Reagens nach Kedde geschätzt. Obwohl nun zum Lösen des Aceton-ouabagenins (X) in Eisessig längeres Kochen erforderlich ist, zeigt das Chromatogramm bei gleicher Arbeitsweise, wie oben angegeben, nach dem Verdünnen mit Wasser noch etwa 50% Acetonid an, erst nach längerem Stehenlassen tritt völlige Hydrolyse ein.

222. Rudolf Tschesche und Gernot Grimmer: Über pflanzliche Herzgifte, XXX. Mittel.¹⁾: Neue Glykoside aus den Blättern von *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata*

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

(Eingegangen am 27. Juni 1955)

Aus den Blättern von *Digitalis purpurea* und *Dig. lanata* wurde Strosposid isoliert. Ferner findet sich hier neben dem bekannten Diginin das cardiotonisch unwirksame Digifolein $C_{28}H_{40}O_8$, das ebenfalls D-Diginose enthält. Nur aus *Dig. purpurea* konnte herzunwirkendes Digipurpurin, $C_{39}H_{64}O_{14}$, isoliert werden. Bei der Säurespaltung gab es 3 Moll. D-Digitoxose und ein Anhydrogenin $C_{21}H_{32}O_4$, das durch Verlust einer Oxygruppe aus dem wahren Aglykon Digipurpurogenin $C_{21}H_{34}O_5$ entstanden war. In *Dig. lanata* wurde unter den stärker wasserlöslichen Glykosiden eine weitere Verbindung in Form des Heptaacetates $C_{36}H_{54}O_{14}$ (C_2H_2O)₇ aufgefunden, welche die Bezeichnung Glucogitofucosid erhielt. In ihr ist Gitoxigenin mit Fucose und Glucose verknüpft. Es konnte festgestellt werden, daß sich Digitalinum verum in den Blättern von *Dig. lanata* acetylfrei findet.

Bei Arbeiten, welche die Isolierung des 1948 von japanischer Seite beschriebenen „Digicorin“ zum Ziele hatten²⁾, waren wir in den Blättern von *Dig. lanata* auf mehrere neue Glykoside gestoßen, von denen wir zunächst Gitorin beschrieben haben³⁾. Dieses Glykosid ist inzwischen von M. Ishidate und M. Okada⁴⁾ auch in den Blättern von *Dig. purpurea* nachgewiesen worden. In einer weiteren Arbeit haben diese Autoren die Angaben über die Isolierung von „Digicorin“ widerrufen⁵⁾. Inzwischen erschienen zwei Ar-

¹⁾ XXIX. Mittel.: R. Tschesche u. G. Snatzke, Chem. Ber. 88, 1558 [1955].

²⁾ K. Tamura, Y. Kobayashi u. K. Tokita, Jap. J. med. Sci. 1, 206 [1948].

³⁾ R. Tschesche, G. Grimmer u. F. Neuwald, Chem. Ber. 85, 1103 [1952].

⁴⁾ Pharmac. Bull. Jap. 1, 304 [1953].

⁵⁾ M. Ishidate, M. Okada u. Y. Sasakawa, Pharmac. Bull. Jap. 1, 186 [1953].