

SUMMARY

d,l-18-Hydroxy-corticosterone (XII, XIII), the *d*-enantiomer (I) of which is probably a direct biogenetic precursor of aldosterone (IIa, b), has been prepared. The synthesis leads from the trihydroxy-diketal IV to the diacetate VI, in which the ketal groups could be split with a mixture of perchloric and acetic acid. The diacetoxy-diketone IX thus obtained was hydrolysed under carefully controlled alkaline conditions to yield the 18-monoacetate XI or the free *d,l*-18-hydroxy-corticosterone (XII). The latter compound exists, however, predominantly in the form of the (20→18)-cyclohemiketal XIII, a conclusion reached from its infrared absorption spectrum and the comparatively slow reduction of tetrazolium salt.

By degradation of XIII with periodic acid the *d,l*-lactone XV was obtained, which is the racemate corresponding to the optically active compound «A 59», isolated from hog adrenal extracts.

By treating the 11 β ,18-dihydroxy-diketals IV and V with aqueous acetic acid, in addition to ketal cleavage intramolecular etherification between the 11 β - and 18-hydroxy groups took place and *d,l*-18-desoxy-aldosterone (*d,l*-11 β ,18-oxido-cortexone) (VII) and its 21-O-acetyl derivative VIII were formed, respectively.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

197. Die Glykoside der Blätter von *Digitalis canariensis* L., *var. isabelliana* (WEBB) LINDINGER

1. Mitteilung¹⁾

von R. Rees, C. R. Gavilanes, W. Meier, A. Fürst und Kuno Meyer

(26. VII. 61)

Eine vor kurzem erschienene Mitteilung von BRETÓN & GONZÁLEZ²⁾ über eine summarische Untersuchung der im Titel genannten *Digitalis*-Art³⁾ (Kurzbezeichnung *D. isabelliana*) veranlasst uns, unsere bisherigen Befunde über denselben Gegenstand bekanntzugeben.

¹⁾ Über die Ergebnisse der hier mitgeteilten Untersuchungen hat der eine von uns (K. M.) am 14. Mai 1960 bei Anlass der 114. Vereinsversammlung des Schweizerischen Apothekervereins in Genf kurz berichtet.

²⁾ J. L. BRETÓN & A. G. GONZÁLEZ, *Chemistry & Ind.* 1960, 205.

³⁾ Andere botanische Bezeichnungen sind: *Isoplexis isabelliana* LIND. & BENTH. und *Callianassa isabelliana* W. & B.; vgl. auch ⁴⁾.

⁴⁾ Diese Bezeichnung stammt von LINDLEY⁵⁾. Nach STOLL & RENZ⁶⁾ besteht die Untergattung *Isoplexis* aus nur 2 *Digitalis*-Arten, nämlich *D. canariensis* L. und *D. canariensis* L., *var. isabelliana* LINDING., Dr. V. H. HEYWOOD, The Hartley Bot. Lab., University of Liverpool, teilte dem einen von uns (K. M.) mit, dass die Neueinteilung der Arten der Gattung *Digitalis* sich z. T. noch in Vorbereitung befindet. Möglicherweise wird deshalb die im Titel dieser Arbeit verwendete botanische Bezeichnung noch eine geringfügige Änderung erfahren. Herrn Dr. J. RENZ, SANDOZ AG., Basel, möchten wir auch an dieser Stelle für die Diskussion der botanischen Nomenklatur bestens danken.

⁵⁾ J. LINDLEY, *Digitalium Monographia*, London 1821.

⁶⁾ A. STOLL & J. RENZ, *Verh. Naturf. Ges. Basel* 67, 392 (1956).

Die nur auf der Insel Gran Canaria vorkommende *D. isabelliana* bildet mit der anderen autochthonen *Digitalis*-Art der Kanarischen Inseln, der *D. canariensis*, die Untergattung *Isoplexis*⁴⁾, die sich von den übrigen krautigen *Digitalis*-Arten (Untergattung *Eudigitalis*) durch ihren strauchartigen Wuchs und durch immergrüne Blätter unterscheidet. Während der eigentliche kanarische Fingerhut (*D. canariensis*) hinlänglich bekannt ist^{7) 12)}, sind u. W. bisher keine chemischen Untersuchungen über die *D. isabelliana* ausser der eingangs erwähnten²⁾ durchgeführt worden. Hingegen ist vor kurzem eine pharmakologische Studie über diese *Digitalis*-Art erschienen¹³⁾, der das bemerkenswerte Ergebnis zu entnehmen ist, dass diese Droge rund 16mal toxischer ist als *Digitalis-purpurea*-Blätter¹⁴⁾. Die auffallend hohe Toxizität liess den Autor zum Schluss kommen, dass diese Pflanze «höchstwahrscheinlich kein Digitalin (Digitoxin) enthält» und «dass die wirksamen Prinzipien der Pflanze nicht der Gruppe der *Digitalis* angehören».

Extraktion der Blätter und Isolierung der Glykoside

Für die Untersuchungen stand uns ein Drogenmaterial zur Verfügung, das der eine von uns (C. R. G.) auf der Insel Gran Canaria gesammelt hatte. Die Extraktion des Blattpulvers erfolgte in verschiedenen Ansätzen mit geringfügigen Abweichungen nach dem von REICHSTEIN und Mitarb. benützten Verfahren¹⁵⁾.

Dabei wurden aus 1 kg Blattpulver erhalten (auf- bzw. abgerundet): 9 g Ätherextrakt, 3 g Chloroformextrakt, 46 g Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt, 13 g Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt und 5 g Chloroform-Alkohol-(3:2)-Extrakt.

Die biologische Prüfung¹⁶⁾ (Methode nach HATCHER-MAGNUS an der Katze) ergab für den Chloroform-Extrakt eine Toxizität von $3,50 \pm 0,56$ mg/kg, für den Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt den Wert $0,76 \pm 0,05$ mg/kg und für den Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt $4,34 \pm 0,59$ mg/kg.

Durch Bestimmung der Anzahl Katzen-Dosen (K. D.) liess sich der Gang der Aufarbeitung gut verfolgen:

7) Diese Art kommt auf der Insel Teneriffa (Tenerife) vor und ist z. B. in Polen⁸⁾, dann auch in den USA⁹⁾, kultiviert worden. Die Blätter sollen nahezu gleich wirksam sein wie diejenigen von *Digitalis purpurea*⁹⁾. Nach BIERNACKI¹⁰⁾ dagegen enthalten sie 1,09% aktive Substanz, d. h. etwa 4–10mal mehr als *Digitalis-purpurea*-Blätter¹¹⁾.

8) C. WEHMER, Die Pflanzenstoffe, Jena 1931, Band 2, S. 1132; O. GESSNER, Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, Heidelberg 1953, S. 212.

9) F. A. MILLER & W. F. BAKER, J. Amer. Pharmac. Assoc. 3, 304 (1914).

10) S. BIERNACKI, Roczniki Farmacji 1, 177 (1923); Chem. Zbl. 1924, II, 212.

11) Übereinstimmende Angaben über den effektiven Glykosidgehalt der letzteren scheint es nicht zu geben. Er dürfte aber auf 0,1–0,3% veranschlagt werden; vgl. z. B. F. NEUWALD, Arch. Pharmaz. 283, 93 (1950).

12) A. G. GONZÁLEZ, Referatenband XIV. Internat. Kongress für reine und angewandte Chemie 1955, S. 160; A. G. GONZÁLEZ & R. CALERO, Anales real. Soc. españ. Fisica Quim. (Madrid) 51 B, 283 und 341 (1955); Chem. Abstr. 49, 12783 b (1955) und 50, 3482 a (1956); J. L. BRETÓN, J. DELGADO & A. G. GONZÁLEZ, Chemistry & Ind. 1959, 513. – Siehe hierzu auch Fussnote 12) bei R. TSCHESCHE, W. FREYTAG & G. SNATZKE, Chem. Ber. 92, 3053 (1959).

13) T. ALDAY REDONNET, Rev. clin. españ. 71, 378 (1958).

14) Internationaler Standard 1949, Methode nach HATCHER-MAGNUS an der Katze.

15) Vgl. z. B. E. ABISCH, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. 42, 1014 (1959).

16) Diese wurde durch Herrn Dr. H. P. BÄCHTOLD in den Pharmakologischen Laboratorien der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel, ausgeführt.

1 kg Blattpulver	100 000 K.D. ¹⁷⁾
Extrakt (aus 1 kg Droge) vor Reinigung mit Pb(OH) ₂	110 000 K.D. ¹⁸⁾
Extrakt nach Reinigung mit Pb(OH) ₂	85 000 K.D.
Chloroform-Extrakt	1 000 K.D.
Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt	60 000 K.D.
Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt	3 000 K.D.
Chloroform-Alkohol-(3:2)-Extrakt	nicht bestimmt
Extrahierte Lösung	1 000 K.D.

Der Äther-Extrakt gab mit KEDDE-Reagens¹⁹⁾ keine Färbung²⁰⁾, der *Chloroform-Extrakt* nur eine schwache Violetrotfärbung²¹⁾. Demgegenüber erwies sich der *Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt* – wie auf Grund der biologischen Prüfung zu erwarten war – als stark KEDDE-positiv. Er gab aus Aceton ein feines Kristallpulver vom Smp. 275–280° (Zers.): *Aceton-Kristallisat* = AK I. Die aus der Mutterlauge kristallisierenden Fraktionen AK II und AK III schmolzen tiefer. Aus dem AK I konnte ein *Methanol-Wasser-Kristallisat* = MWK vom Smp. 274–283° (Zers.) gewonnen werden, dessen Toxizität mit $0,54 \pm 0,04$ mg/kg ermittelt wurde. Ein aus dem gleichen Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt erhaltenes *Methanol-Chloroform-Kristallisat* = MCK schmolz bei 291–296° (Zers.). MWK und MCK unterschieden sich papierchromatographisch praktisch nicht voneinander. Das letztere war jedoch schwerer löslich, weshalb seine Toxizität nicht genau ermittelt werden konnte.

Die in Aceton löslichen Anteile des *Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extraktes* gaben im Gegensatz zu den unlöslichen mit KEDDE-Reagens keine Färbung. Nach saurer Hydrolyse der letzteren wurde sehr wenig eines Geningemisches erhalten, das nach Papierchromatogramm nur Digitoxigenin (I) und Uzarigenin (III) enthielt. Die *Chloroform-Alkohol-(2:1)-* und *-(3:2)-Extrakte* wurden nicht weiter untersucht.

Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen betreffen nur den Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt.

Für die *papierchromatographischen Untersuchungen* konnte kein System aufgefunden werden, das eine völlige Auftrennung des Glykosidgemisches in die einzelnen Komponenten erlaubt hätte. Mit dem von KAISER²²⁾ angegebenen Lösungsmittelsystem (KAISER II) sowie mit dem von REICHSTEIN *et al.*²³⁾ für stark polare Glykoside empfohlenen System (n-Butanol-Toluol-(1:1)/Wasser) liess sich eine teilweise Auftrennung des Glykosidgemisches erreichen. Der rohe Extrakt zeigte neben zwei nicht scharf voneinander getrennten Hauptflecken – Glykoside A und C – deutliche Flecke der Glykoside E und D sowie eines weiteren Glykosids F. Demgegenüber gaben die

¹⁷⁾ Das Standardpulver von *D. purpurea* (1957) vom Eidg. Gesundheitsamt in Bern zeigte unter den gleichen Versuchsbedingungen eine 12–13mal geringere Toxizität. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit den von ALDAY REDONNET erhaltenen Ergebnissen¹³⁾.

¹⁸⁾ Die hier gegenüber dem Blattpulver gefundene höhere Toxizität dürfte innerhalb der Fehlerbreite liegen.

¹⁹⁾ D. L. KEDDE, Diss. Leyden 1946; vgl. auch J. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.* 52, 643 (1952). Ausgeführt als Tüpfelprobe auf Papier.

²⁰⁾ BRETÓN & GONZÁLEZ¹²⁾ geben demgegenüber an, dass sie im Äther-Extrakt Glykoside erhalten haben.

²¹⁾ Eine eingehende Untersuchung dieses Teils ist noch nicht abgeschlossen und wird Gegenstand der 2. Mitteilung über *D. isabelliana* sein.

²²⁾ F. KAISER, *Chem. Ber.* 88, 556 (1955). Dieses System wurde *absteigend* benützt, um grössere Laufstrecken zu erzielen, siehe exper. Teil dieser Arbeit.

²³⁾ E. SCHENKER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 680 (1954).

Kristallisate AK I und das daraus bereitete MWK sowie das MCK im System KAISER II neben den beiden sehr ausgeprägten Hauptflecken nur zwei kaum wahrnehmbare Flecke der Glykoside E und D. Diese papierchromatographischen Befunde sind in Fig. 1 a und b wiedergegeben. Der in Fig. 1 b noch eingezeichnete Fleck des Glykosids B ist als solcher nicht sichtbar, muss aber mit einem der Flecke von A und C zusammenfallen, wie weiter unten noch ausgeführt wird.

Papierchromatogramme von Glykosiden aus den Blättern von Digitalis isabelliana

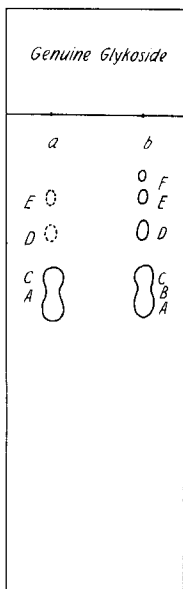


Fig. 1

- a Erstes Aceton-Rohkristallisat (AK I) bzw. Methanol-Wasser-Rohkristallisat (MWK).
 b Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt in Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid-(50:50:6,5)/Formamid (20 Std.)

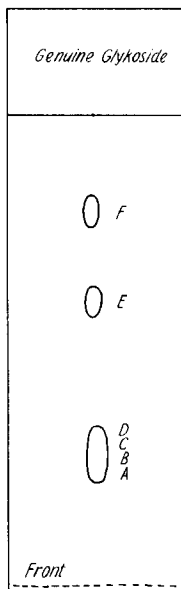


Fig. 2

- Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt in Toluol-Butanol-(2:1)/Wasser (ca. 5 Std.)

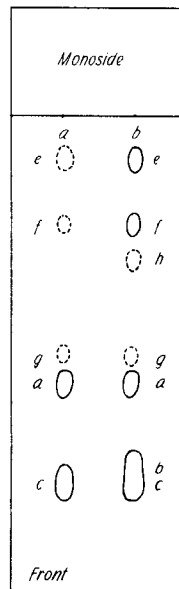


Fig. 3

- a aus erstem Aceton-Rohkristallisat
 b aus Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt in Chloroform/Formamid (2½ Std.)

Versuche zur Isolierung der Glykoside A, C, E und F. Der Versuch einer präparativen Aufteilung der beiden Hauptglykoside als Acetylverbindungen an Al_2O_3 ²⁴⁾ war erfolglos. Es wurde lediglich eine Anreicherung der Acetylverbindungen des Glykosids C in den ersten und des Glykosids A in den späteren Fraktionen der Chromatographie erzielt²⁵⁾.

²⁴⁾ H. ROSENMUND & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.* 17, 176 (1942).

²⁵⁾ Für die Kontrolle der eluierten Acetylverbindungen auf Einheitlichkeit konnte kein geeignetes papierchromatographisches Verfahren ausfindig gemacht werden. Es wurden deshalb jeweils kleine Proben der Eindampfrückstände der einzelnen Chromatographie-Fraktionen mit $KHCO_3$ in Methanol-Wasser verseift und die so gewonnenen freien Glykoside im Papierchromatogramm (System Fig. 1) geprüft.

Im Unterschied zu den Hauptglykosiden A und C liessen sich die Nebenglykoside E und F, besonders mit dem in Fig. 2 angegebenen System, recht gut trennen. Wir haben deshalb eine Aufteilung dieser Glykoside durch präparative Papierchromatographie²⁶⁾ durchgeführt und benützten dazu Mutterlaugenrückstände von Aceton-Kristallisaten. Es gelang, das Glykosid E in papierchromatographisch einheitlicher Form zu gewinnen, doch liess sich dieses bis jetzt nicht kristallisieren. Das rohe Glykosid F, das ebenfalls nicht in Kristallen erhalten werden konnte, enthielt dagegen noch wenig des Glykosids E.

Isolierung der Monoside a und c und ihre Verknüpfung mit den Glykosiden A und C. Wird das AK I der milden sauren Hydrolyse unterworfen, so wird rund die Hälfte dieses Glykosidgemisches zu den freien Aglykonen gespalten. Aus den wasserlöslichen Hydrolyseprodukten liess sich leicht und in guter Ausbeute Digilanidobiose²⁷⁾ gewinnen. In Übereinstimmung mit diesem Befund wurden bei der Fermentierung mit Strophanthobiase²⁸⁾ Monoside gebildet, die sich vom unveränderten Ausgangsmaterial durch Ausschütteln mit Chloroform abtrennen liessen. Im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 3a) konnten 5 KEDDE-positive Substanzen, die wir mit a, c, e, f und g bezeichnen, nachgewiesen werden. Auf Grund der Farbintensität und der Fleckengrösse liess sich abschätzen, dass das Monosidgemisch zur Hauptsache a und c enthielt. Dies liess sich durch präparative Chromatographie an Al_2O_3 erhärten: 85–90% der Eluate bestanden aus den Monosiden a und c, die beide in Kristallen vom Smp. 241–244° gewonnen werden konnten. Wie oben bereits ausgeführt, war bei der chromatographischen Aufteilung der acetylierten Glykoside an Al_2O_3 lediglich eine Anreicherung von A und C in gewissen Fraktionen erzielt worden. Kleine Proben davon wurden mit $KHCO_3$ in wässrigem Methanol verseift und die dabei erhaltenen freien Glykoside mit Strophanthobiase²⁸⁾ zur Monosidstufe abgebaut. Auf papierchromatographischem Wege liess sich dann zeigen, dass dem Glykosid A das Monosid a und dem Glykosid C das Monosid c zugrunde liegen.

Isolierung der Monoside a, b, c, e, f, g und h, und Verknüpfung von e und f mit den Glykosiden E und F. Nach Fermentierung der Mutterlaugen von AK I oder der Kristalle von AK II bzw. AK III sowie des rohen Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extraktes erhält man ein Monosidgemisch, das im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 3b) erwartungsgemäss einen Fleck gibt, der dem Monosid c entspricht. Dieser Fleck wird hier aber nicht allein durch dieses Monosid, sondern noch durch ein weiteres (= b), dessen Vorstufe (Glucosido-Verbindung) in AK I nicht enthalten ist, hervorgerufen. Durch Chromatographie eines solchen Monosidgemisches an Al_2O_3 liess sich das reine Monosid b in Kristallen vom Smp. 210–214° gewinnen. Die späteren Chromatographie-Fraktionen enthielten Gemische der Monoside a, b, c, f, g und h. In den letzten Eluaten war vor allem das Monosid e (neben sehr wenig f) enthalten. Das reine Monosid e schmolz bei 222–224°.

Mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie²⁶⁾ konnten schliesslich die durch Al_2O_3 vorgetrennten Monosidgemische weiter aufgeteilt werden, und es liessen

²⁶⁾ E. VON ARX & R. NEHER, *Helv.* 39, 1664 (1956).

²⁷⁾ H. LICHTI & A. VON WARTBURG, *Helv.* 44, 238 (1961); weitere Literatur daselbst. Wir danken Herrn Dr. A. VON WARTBURG, SANDOZ AG., Basel, bestens für die Überlassung einer Vergleichsprobe.

²⁸⁾ A. STOLL & J. RENZ, *Enzymologia* 7, 362 (1939).

sich dabei die einheitlichen Monoside a (Smp. 238–244°), g (Smp. 225–230°), h (Smp. 217–227°), f (Smp. 152–156°) und e (Smp. 210–218°) gewinnen.

Das durch präparative Papierchromatographie gewonnene amorphe Glykosid E und das rohe Glykosid F (siehe oben) wurden mit Strophanthobiase abgebaut. Papierchromatographische Untersuchungen der chloroformlöslichen Anteile ergab, dass das Monosid e dem Glykosid E und das Monosid f dem Glykosid F zugrunde liegen.

Zusammenfassung und Diskussion der bisherigen Ergebnisse. Abbau des Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extraktes aus *D. isabelliana* mit Strophanthobiase führte zu einem Monosidgemisch, das in 7 einheitliche Substanzen aufgeteilt werden konnte. Daraus kann gefolgert werden, dass im Extrakt mindestens 7 zuckerreichere Vorstufen (Diglykoside) enthalten waren. Davon konnten 5, nämlich die Glykoside A, C, D, E und F, papierchromatographisch nachgewiesen werden (siehe Fig. 1). Diese konnten, mit Ausnahme von D, eindeutig mit den ihnen zugrunde liegenden Monosiden a, c, e und f verknüpft werden. Wir nehmen an, dass aus dem papierchromatographisch nicht erfassten Glykosid B das Monosid b hervorgegangen ist. Dafür sprechen die folgenden Befunde und Überlegungen: Da im AK I auf papierchromatographischem Wege das Glykosid D jeweils gut nachweisbar ist, b im Monosidgemisch aus AK I aber fehlt, kann das Glykosid D nicht als Muttersubstanz des Monosids b in Frage kommen, sondern dürfte nach fermentativem Abbau die Monoside g oder h geben. Da b aber in den Monosidgemischen – mit Ausnahme des aus AK I gewonnenen – jeweils in *relativ grosser* Menge vorkommt, müsste das ihnen zugrunde liegende Glykosid B papierchromatographisch bemerkbar sein. Es ist deshalb anzunehmen, dass B in den von uns benützten Systemen denselben Rf-Wert aufweist wie die Glykoside A oder C.

Chemische Untersuchung der Monoside

Die Monoside b, c, a und h enthalten auf Grund der KELLER-KILIANI-Reaktion²⁹⁾ einen 2-Desoxyzucker und liessen sich demzufolge unter milden sauren Bedingungen zum freien Zucker und zum genuinen Aglykon hydrolysieren.

Das *Monosid b* konnte durch direkten Vergleich als *Evatromonosid*^{30) 31)} (*Digitoxigenin-digitoxosid*) identifiziert werden und gab nach hydrolytischer Spaltung dementsprechend Digitoxigenin (I) und D(+)-Digitoxose (V).

Hydrolyse der *Substanz c* ergab als Aglykon Uzarigenin (III). Das daraus bereitete Acetylprodukt zeigte völlige Übereinstimmung mit authentischem Acetyluzarigenin (IV). Die Zuckerkomponente konnte als D(+)-Digitoxose identifiziert werden. Es handelt sich somit beim Monosid c um ein *Uzarigenin-digitoxosid*. (Über die glykosidische Bindung siehe weiter unten.)

Die *Substanz a* enthält ebenfalls Uzarigenin (III) als Aglykon. Ihr 2-Desoxyzucker kristallisierte bisher nicht, zeigte aber als roher, durch Destillation gereinigter Sirup in 4 Systemen (siehe exper. Teil) praktisch dieselben Rf-Werte wie Boivinose (VI)^{31) 32)}.

²⁹⁾ Ausführung nach J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 31, 883 (1948).

³⁰⁾ R. TSCHESCHE, S. WIRTZ & G. SNATZKE, *Chem. Ber.* 88, 1619 (1955); vgl. auch F. KAISER, E. HAACK & H. SPINGLER, *Liebigs Ann. Chem.* 603, 75 (1957).

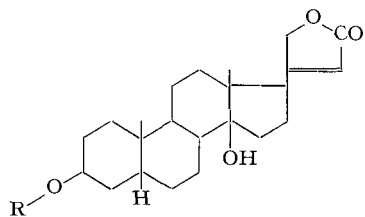
³¹⁾ Herrn Prof. T. REICHSTEIN möchten wir auch an dieser Stelle bestens für die Überlassung von Vergleichsmaterial danken.

³²⁾ O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 35, 730 (1952); H. R. BOLLIGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 36, 302 (1953).

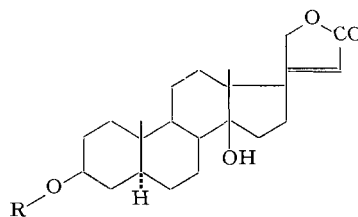
Die spez. Drehung des amorphen Zuckers betrug $+50^\circ$ (in Aceton); für D-Boivinose wurde demgegenüber ein Wert von -15° (in Aceton) gefunden³²⁾.

Wegen Substanzmangels liess sich nur eine orientierende Hydrolyse des *Monosids h* durchführen. Sie ergab ein Aglykon, das im Papierchromatogramm eindeutig polarer war als Uzarigenin (III) und Digitoxigenin (I). Es konnte bisher mit keinem bekannten Aglykon identifiziert werden. Die Zuckerkomponente des Monosids *h* verhielt sich im Papierchromatogramm wie der 2-Desoxyzucker aus dem Monosid *a*.

Die *Monoside g, f und e*, die alle drei eine negative KELLER-KILIANI-Reaktion zeigten, wurden nach der Methode von MANNICH & SIEWERT³³⁾ hydrolysiert und



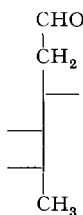
I (R = H) Digitoxigenin
F. 250° [$+19$ Me]³⁴⁾
II (R = Ac) F. 220° [$+19$ Chf]³⁵⁾



III (R = H) Uzarigenin
F. $230-246^\circ$ [$+14$ Me]³⁵⁾
IV (R = Ac) F. 267° [$+8$ Chf]³⁵⁾



V D-Digitoxose
F. $108-110^\circ$
[$+38$ Me]³⁶⁾



VI D-Boivinose
F. $96-98^\circ$
[-15 An]³²⁾



VII D-Gulomethylose
F. $130-131^\circ$
[-38 W]³⁷⁾
[-45 Me]³⁸⁾



VIII D-Allo-methylose
F. $151-152^\circ$
[-1 W]³⁹⁾
[-8 Me]³⁸⁾



IX D-Gluco-methylose
F. $139-140^\circ$
[$+30$ W]⁴⁰⁾
[$+107$ Me]³⁸⁾

Ac = CH₃CO-. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Grade auf- bzw. abgerundete spez. Drehung für Na-Licht in folgenden Lösungsmitteln an: An = Aceton, Chf = Chloroform, Me = Methanol, W = Wasser.

gaben alle drei Digitoxigenin (I) als Aglykon. Dieses Genin konnte allerdings nur aus den Hydrolyseprodukten des Monosids *e* in Kristallen gewonnen und durch direkten Vergleich identifiziert werden. Das aus dem Monosid *g* bzw. *f* gewonnene Aglykon liess sich wegen Mangels an Substanz nur papierchromatographisch untersuchen und zeigte dabei gleiches Verhalten wie Digitoxigenin. Der bei der MANNICH-Spaltung

³³⁾ C. MANNICH & G. SIEWERT, Ber. deutsch. chem. Ges. **75**, 737 (1942).

³⁴⁾ A. WINDAUS & G. STEIN, Ber. deutsch. chem. Ges. **67**, 2436 (1928).

³⁵⁾ S. RANGASWAMI & T. REICHSTEIN, Helv. **32**, 939 (1949).

³⁶⁾ H. R. BOLLIGER & P. ULRICH, Helv. **35**, 93 (1952).

³⁷⁾ P. A. LEVENE & J. COMPTON, J. biol. Chemistry **111**, 335 (1935).

³⁸⁾ Dieser Wert wurde von uns ermittelt.

³⁹⁾ P. A. LEVENE & J. COMPTON, J. biol. Chemistry **116**, 169 (1936).

⁴⁰⁾ E. FISCHER & K. ZACH, Ber. deutsch. chem. Ges. **45**, 3761 (1912).

aus dem Monosid e erhaltene Zucker liess sich kristallisieren und war mit *D-Glucomethylose (IX)* identisch, *die hier zum ersten Mal als Zuckerkomponente von Herzglykosiden aufgefunden wurde.* – Die beiden Zucker der Monoside g und f, die nur in kleinen Mengen gewonnen werden konnten, dürften auf Grund ihres papierchromatographischen Verhaltens identisch mit *D-Gulomethylose (= Antiarose) (VII)* bzw. *D-Allomethylose (VIII)* sein.

In der folgenden Tabelle 1 sind die für die Monoside und – soweit hergestellt – auch die für ihre Acetylderivate ermittelten physikalischen Daten zusammengestellt.

Tabelle 1. Konstanten der Monoside und ihrer Acetylverbindungen

Bezeichnung	Chemischer Name	Smp.	$[\alpha]_D^{20}$ *)	Aglykon	Zucker
b	Digitoxigenin-digitoxosid = Evatromonosid	210–214°	– 15,0° Me	Digitoxigenin	D-Digitoxose
	O-Acetyl-b	219–222°	+ 13,3° Chf		
c	Uzaringenin-digitoxosid	241–244°	– 17,2° Me	Uzaringenin	D-Digitoxose
	O-Acetyl-c	250–253°	+ 7,9° Chf		
a	Uzaringenin-2-desoxosid	241–244°	– 29,2° Me	Uzaringenin	2-Desoxy- zucker
	O-Acetyl-a	267–273°	– 15,4° Chf		
h	?	217–227°	–	?	2-Desoxy- zucker
g	Digitoxigenin-gulomethylosid	225–230°	– 5,2° Chf – 9,9° Me	(Digitoxigenin)	(Gulo- methylose)
f	Digitoxigenin-allomethylosid	152–156°/ 230–235°	– 11,6° Me	(Digitoxigenin)	(Allo- methylose)
	Digitoxigenin-glucomethylosid	222–224°	– 11,4° Me	Digitoxigenin	D-Gluco- methylose
e	O-Acetyl-e	232–246°	– 1,8° Chf		

*) Me = Methanol, Chf = Chloroform.
Die in Klammern aufgeführten Substanzen sind nur auf papierchromatographischem Wege identifiziert worden.

Tabelle 2. Molekulare Drehungsbeiträge der Zuckerreste

	$\Delta [M]_D$ in Methanol
β -D-Digitoxosido-Rest im Uzaringenin-digitoxosid (= Monosid c)	– 149° \pm 18°
β -D-Gulomethylosido-Rest im Digitoxigenin-gulomethylosid (= Monosid g)	– 123° \pm 18°
β -D-Allomethylosido-Rest im Digitoxigenin-allomethylosid (= Monosid f)	– 131° \pm 34°
β -D-Glucomethylosido-Rest im Digitoxigenin-glucomethylosid (= Monosid e)	– 131° \pm 12°
β -D-Digitoxosido-Rest im Evatromonosid (= Monosid b)	– 146° \pm 18°
β -D-Digitoxosido-Rest im Boistroxid ⁴³⁾	– 140° \pm 18°
β -D-Gulomethylosido-Rest im Desgluco-cheirotoxin ⁴⁴⁾	– 172° \pm 19°
β -D-Allomethylosido-Rest im Gofrusid ⁴⁵⁾	– 189° \pm 19°

Auf Grund der molekularen Drehungsbeiträge der Zucker (vgl. Tabelle 2) ergibt sich nach KLYNE⁴¹⁾ für die Monoside b, c, g, f und e β -glykosidische Verknüpfung,

⁴¹⁾ W. KLYNE, Proc. Biochem. Soc., Biochem. J. 47, XLI (1950).

was der Regel entspricht, wonach fast alle natürlichen digitaloiden Glykoside von D-Zuckern in der β -Form vorliegen⁴²⁾.

Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Substanzproben zur Bestimmung der spez. Drehung wurden 1 Std. bei 0,02 Torr und 70° getrocknet, Zuckerproben 1 Std. bei 0,02 Torr und 45°.

Es werden die folgenden Abkürzungen benützt: AcOH = Eisessig, (Ac)₂O = Acetanhydrid, Ä = Äther, Al = Alkohol, An = Aceton, Bz = Benzol, Bu = n-Butanol, Chf = Chloroform, Fmd = Formamid, Me = Methanol, Mäk = Methyläthylketon, Pe = Pentan, Py = Pyridin, To = Toluol, Thf = Tetrahydrofuran, W = Wasser, ML = Mutterlaugnrückstände, Pchr = Papierchromatographie bzw. Papierchromatogramm.

Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chf-Ä-(1:3), Waschen mit 2N HCl, 2N Sodalösung und W, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum.

Die Papierchromatographie wurde bei 20° ± 2°, wo nichts anderes vermerkt, auf WHATMAN-No. 1-Papier ausgeführt. Die Sichtbarmachung der gewanderten Substanzen erfolgte bei Butenoliden mit KEDDE-Reagens¹⁹⁾, bei Zuckern mit Anilinphthalat⁴⁶⁾.

Extraktion der Blätter. – *Beispiel:* 0,98 kg luftgetrocknete Blätter, die in der Kugelmühle staubfein gemahlen worden waren, wurden mit 1,25 l W befeuchtet, mit 1,25 l Al versetzt und 1½ Std. unter häufigem Umschwenken in einem Wasserbad von 60° gehalten. Hierauf wurde durch ein mit Hyflo-Supercel gedichtetes Filter abgenutscht und der Rückstand in derselben Weise noch ein weiteres Mal mit 2 l 50-proz. Al sowie 2mal mit je 2 l 70-proz. Al und 2mal mit je 1,7 l 96-proz. Al extrahiert. Die vereinigten Auszüge – mit Ausnahme des letzten Auszuges mit 96-proz. Al – wurden bei 50° (Badtemp.) im Vakuum bis zu einem Totalvolumen von 1 l eingeeengt und mit dem letzten 96-proz. Al-Auszug (= 1 l) versetzt. Diese (etwa 50-proz.) Al-Lösung wurde mit frisch aus 1,2 kg Bleidiacetat-trihydrat bereitetem und neutral gewaschenem Pb(OH)₂ 30 Min. auf der Maschine geschüttelt, durch ein mit Hyflo-Supercel gedichtetes Filter genutscht, der Rückstand mit 500 ml 50-proz. Al aufgeschlemmt, wieder abgenutscht und mit wenig 50-proz. Al nachgewaschen. Das Filtrat gab mit wässriger basischer Bleiacetat-Lösung nur noch eine geringe Trübung. Es wurde mit 2N H₂SO₄ auf ein pH von 6 gebracht und auf etwa 1 l eingeeengt, wobei das pH bei etwa 6 gehalten wurde. Diese Lösung wurde im Scheidetrichter 4mal mit je 2 l Ä extrahiert, dann 4mal mit je 1 l Chf, 5mal mit je 1 l Chf-Al-(4:1), 8mal mit je 1 l Chf-Al-(2:1) und 4mal mit je 1 l Chf-Al-(3:2) ausgeschüttelt⁴⁷⁾. Die einzelnen Auszüge wurden der Reihe nach mit je 150 ml W (einmal), 2N Na₂CO₃-Lösung (2mal) und W (2mal) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Es wurden erhalten: 8,9 g Ä-Extrakt, 3,1 g Chf-Extrakt, 46,2 g Chf-Al-(4:1)-Extrakt (wobei der fünfte Extrakt noch 3,5 g Material enthielt), 12,7 g Chf-Al-(2:1)-Extrakt und 5,1 g Chf-Al-(3:2)-Extrakt.

I. Untersuchungen ohne vorherige Fermentierung

1. *Äther-Extrakt:* Dunkelgrünes Öl, KEDDE-Reaktion¹⁹⁾ negativ. Wurde nicht weiter untersucht.

2. *Chloroform-Extrakt:* Schwach violettrote Färbung mit KEDDE-Reagens¹⁹⁾. Wurde noch nicht näher untersucht.

3. *Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt.* – a) *Aceton-Rohkristallisate.* *Beispiel:* 46,2 g Chf-Al-(4:1)-Extrakt (entsprechend 0,98 kg Droge) wurden in 1,5 l An aufgenommen und die Lösung auf dem Dampfbad etwas eingeeengt. Hierbei fiel ein feines Kristallpulver aus, das nach dem Abkühlen durch Absaugen isoliert wurde. Einengen der Mutterlauge gab weitere Mengen an An-Roh-

⁴²⁾ Dies kann allerdings nicht mit Bestimmtheit für die Monoside g und f gefolgert werden.

⁴³⁾ O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 35, 673 (1952).

⁴⁴⁾ J. A. MOORE, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 775 (1954).

⁴⁵⁾ A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 35, 1073 (1952).

⁴⁶⁾ S. M. PARTRIDGE, *Nature* 164, 443 (1949).

⁴⁷⁾ Vor dem Ausschütteln mit Chf-Al-(3:2) wurde die wässrige Phase bis zur Sättigung mit festem Na₂SO₄ versetzt.

kristallisaten. Es wurden in diesem Beispiel erhalten: 7,5 g AK I, Smp. 274–281° (Zers.), 6 g AK II und 3,2 g AK III, Smp. 235–270° (Zers.).

b) *Methanol-Wasser-Rohkristallisate*. 7,5 g AK I wurden in 800 ml Me-W-(1:1) von etwa 80° aufgenommen und vom Ungelösten (ca. 2 g) abfiltriert. Aus dem klaren Filtrat schieden sich beim Einengen 2,7 g feine Kristallnadelchen = MWK I vom Smp. 274–283° (Zers.) aus. 6,0 g AK II gaben ca. 2 g Ungelöstes und 2 g Kristalle = MWK II, Smp. 218–248° (Zers.).

c) *Methanol-Chloroform-Rohkristallisate*. Der Chf-Al-(4:1)-Extrakt konnte durch Erwärmen in Chf-Me-(1:1) völlig in Lösung gebracht werden. Beim Wegdampfen des Chf schied sich ein leicht grau gefärbtes Kristallpulver = MCK aus, das bei 282–284° (Zers.) schmolz. Umlösen aus demselben Lösungsmittelgemisch gab beinahe weisse Kristallnadelchen vom Smp. 291–296° (Zers.).

4. *Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt*: Die 12,7 g Rückstand wurden mit 500 ml An heiss behandelt und vom Ungelösten abfiltriert. Die Lösung zeigte negative KEDDE-Reaktion. Das in An Unlösliche (6,4 g) gab eine positive KEDDE-Reaktion. Es war in Me-Chf-(1:1) löslich, liess sich aber nicht kristallisieren. 910 mg wurden in einem Gemisch von 20 ml Me und 20 ml 0,1 N H_2SO_4 aufgenommen und auf dem Dampfbad 30 Min. erhitzt. Nach dem Verjagen des Me im Vakuum wurde die verbliebene wässrige Lösung zuerst mit Chf-Ä-(1:1) ausgeschüttelt. Dabei wurden 50 mg rohes KEDDE-positives Geniemisch extrahiert. Dieses enthielt nach Pchr nur Digitoxigenin (I) und Uzarigenin (III). Durch Ausschütteln mit Chf-Al-(4:1) liessen sich noch 145 mg KEDDE-positives Material gewinnen, das nicht weiter untersucht wurde.

5. *Chloroform-Alkohol-(3:2)-Extrakt*: Nur schwach KEDDE-positiv; wurde nicht weiter untersucht.

Versuch zur Isolierung der Glykoside A und C. 9,4 g ML, die beim Umkristallisieren von verschiedenen AK I aus Me-W angefallen waren, wurden in Py-(Ac)₂O acetyliert. Das nach üblicher Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt (10 g) wurde an 270 g Al_2O_3 chromatographiert. Zur papierchromatographischen Kontrolle der einzelnen Fraktionen wurden jeweils kleine Proben mit $KHCO_3$ in wässrigem Me verseift und die zurückgewonnenen freien Glykoside im System KAISER II²³) untersucht. Es zeigte sich dabei, dass in den Chf-Bz-(2:3)-Eluaten Substanz C (als Acetylverbindung) angereichert war, während Chf-Bz-(7:3) und Chf mehr Substanz A (als Acetylverbindung) eluierten. Die in Bezug auf acetyliertes A und C angereicherten Fraktionen wurden gesondert vereinigt und in wässrigem Me mit $KHCO_3$ verseift²⁴). Enzymatische Spaltung siehe weiter unten.

Isolierung der Glykoside E und F. 1,3 g ML von AK I wurden auf 130 WHATMAN-No. 1-Papierbogen (19×42 cm), die mit der stationären Phase (W mit To-Bu-(2:1) gesättigt) imprägniert worden waren, auf der Startlinie aufgetragen. Hierauf wurden die Papierbogen im Schlitztrogl²⁶) 5 Std. entwickelt (vgl. Fig. 2). Die die Glykoside E und F enthaltenden Zonen wurden aus den getrockneten Papierbogen ausgeschnitten, zerkleinert, in W geweicht, dann 2mal mit 50-proz., 2mal mit 70-proz. und 2mal mit 100-proz. Me extrahiert. Verdampfen der Auszüge im Vakuum gab 170 mg rohes Glykosid E und 88 mg rohes Glykosid F. Die breite Zone der Glykoside A, B, C und D wurde nicht extrahiert. – Die rohen Glykoside E und F wurden von den aus dem Papier stammenden Verunreinigungen durch Filtration über mehrmals regeneriertem Al_2O_3 ⁴⁸) befreit. Mit Chf-Me-(1:1) sowie mit Me liessen sich so 56 mg gereinigte Substanz E bzw. 26 mg gereinigte Substanz F gewinnen. Die beiden Glykoside konnten aber nicht zur Kristallisation gebracht werden. Substanz F enthielt nach Pchr noch etwas E. Enzymatischer Abbau dieser beiden Glykoside siehe weiter unten.

Isolierung von Digilaniidobiose. 32 g ML, die bei der Bereitung von Aceton-Rohkristallisaten angefallen waren, wurden in 85 ml Me gelöst, mit 85 ml 0,1 N H_2SO_4 versetzt und 30 Min. auf dem Dampfbad unter Rückfluss im Sieden gehalten. Nach Abkühlen und Zufügen von 85 ml W wurde das Me im Vakuum entfernt. Aus der wässrigen Phase liessen sich mit den folgenden Lösungsmitteln die in Klammern angegebenen Substanzmengen ausschütteln: Chf-Ä-(1:1) (8,99 g), Chf (1,26 g) und Chf-Al-(2:1) (15,1 g). – Die extrahierte wässrige Phase wurde mit frischbereitetem $BaCO_3$ (aus 5 g $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$) versetzt, durch ein mit $BaCO_3$ gedichtetes Filter filtriert und im Vakuum auf etwa 50 ml eingengt. Nach 2maligem Ausschütteln mit Chf-

⁴⁸) Dieses enthält keine methanollöslichen Stoffe mehr.

Al-(2:1) wurde mit 2 g Aktivkohle versetzt, kurz aufgeköcht und durch eine Schicht Zellulosepulver filtriert. Das klare Filtrat gab beim Eindampfen im Vakuum 5,6 g rohen Zuckersirup. Dieser wurde mit Me verflüssigt, wobei 2 g feine Kristallnadelchen ausfielen, die bei 218–222° schmolzen. (Aus der Mutterlauge wurden auf Zusatz von An noch weitere 0,9 g Kristalle erhalten.) Die Mischung mit Digilaniidobiose²⁷⁾ vom Smp. 222–227° schmolz bei 220–226°. Im System Bu-AcOH-W-(4:1:5) wurde nur 1 Fleck erhalten, der den Rf-Wert der Digilaniidobiose aufwies.

II. Untersuchungen nach Fermentierung mit Strophanthobiase

Isolierung der Monoside a und e. 10,3 g AK I wurden in etwa 5 l W von 60° eingetragen, wobei der grösste Teil in Lösung ging, und mit 10 g Strophanthobiase²⁸⁾ versetzt. Nach Zufügen einiger ml To wurde 20 Tage bei 37° unter häufigem Umschwenken stehengelassen und hierauf im Vakuum bei 60° Badtemperatur auf etwa 500 ml eingengt. Nach Versetzen mit 2,5 l Al wurde durch ein mit Hyflo-Supercel gedichtetes Filter filtriert, das Filtrat im Vakuum auf etwa 300 ml eingengt und 4mal mit je 300 ml Chf, Chf-Al-(4:1)- und Chf-Al-(2:1)-Gemischen extrahiert. Die einzelnen Auszüge passierten 2 mit wenig W beschickte Scheidetrichter und wurden dann im Vakuum zur Trockne eingedampft. Es resultierten 4 g Chf-Extrakt (Monosidgemisch), 2,8 g Chf-Al-(4:1)-Extrakt und 0,2 g Chf-Al-(2:1)-Extrakt. Der Chf-Extrakt wurde an 120 g Al₂O₃ chromatographiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3. *Chromatographie des Monosidgemisches (aus AK I)*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel je 400 ml pro Fraktion	roh		Kristalle	
		Menge in mg	Pchr	Menge in mg	Smp.
1–5	Bz-Chf-(7:3)	35	c		
6	Bz-Chf-(4:6)	70	c		
7–13	Bz-Chf-(4:6)	1060	c	660	210–234°
14–15	Chf	205	c	120	210–231°
16–18	Chf	195	c, a	110	
19–20	Chf-Me-(99:1)	585	c, a		
21–25	Chf-Me-(99:1)	860	a	500	240–245°
26	Chf-Me-(97:3)	360	a	225	230–243°
27–30	Chf-Me-(97:3)	285	a, g, h, f, e		
31–33	Chf-Me-(9:1)	70	a, g, h, f, e		
34	Me	80			

Die mit An-Ä erhaltenen Kristalle aus den Fraktionen 7–15 wurden umgelöst: 550 mg Substanz c vom Smp. 241–244°. Die auf gleiche Weise aus den Fraktionen 21–26 erhaltenen Kristalle wurden vereinigt und aus Me-Ä umkristallisiert: 655 mg Substanz a vom Smp. 241–245°.

Verknüpfung der Monoside a und c mit den Glykosiden A und C. Kleine Proben der an Glykosid A bzw. C angereicherten Fraktionen (Seite 1616) wurden wie oben beschrieben mit Strophanthobiase fermentiert. Die aus beiden Ansätzen gewonnenen Chf-Extrakte wurden im System Bz-Chf-(7:3)/Fmd papierchromatographisch untersucht: der dem Monosid a entsprechende Fleck (KEDDE) war grösser und intensiver bei dem Monosidgemisch, das aus der Probe gewonnen worden war, die das Glykosid A angereichert enthielt, während sich das Monosidgemisch aus den an Glykosid C angereicherten Fraktionen gerade umgekehrt verhielt.

Isolierung der Monoside a, b, c, e, f, g und h, und Verknüpfung von e und f mit den Glykosiden E und F. Aus 30 g ML von verschiedenen Aceton-Kristallisaten konnten nach Fermentierung mit Strophanthobiase 11,1 g Chf-Extrakt (= Monosidgemisch) erhalten werden, die direkt an Al₂O₃ chromatographiert wurden. Die dabei erzielten Resultate sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Die aus den Fraktionen 4–5 mit An erhaltenen Kristalle wurden aus An-Ä-Pe umkristallisiert und lieferten 120 mg b vom Smp. 210–214°. Die Kristalle aus Fraktion 6 wurden ohne weiteres

Tabelle 4. *Chromatographie der Monoside (aus ML der Aceton-Kristallisate)*

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel je 1100 ml pro Fraktion	roh		Kristalle	
		Menge in mg	Pchr	Menge in mg	Smp.
1-3	Bz-Chf-(4:6)	2200	KEDDE-neg.		
4-5	Bz-Chf-(4:6)	520	b	170	199-204°/209-210°
6	Bz-Chf-(4:6)	185	b	114	198-212°
7	Bz-Chf-(4:6)	270	b, c		
8-14	Chf	2342	b, c		
15-16	Chf-Me-(99:1)	570	b, c		
17-18	Chf-Me-(99:1)	370	c, a, g, e		
19-21	Chf-Me-(97:3)	945	c, a, g, h		
22	Chf-Me-(97:3)	100	f, e		
23-25	Chf-Me-(9:1)	598	f, e		
26	Chf-Me-(9:1)	435	f, e	300	215-220° (186°)
27-29	Chf-Me-(7:3)	579	f, e	400	210-215° (190°)
30-33	Chf-Me-(7:3)	200	f, e	amorph	

Umlösen direkt hydrolysiert (siehe weiter unten). Fraktion 26 gab aus Me-W 300 mg rohe Kristalle von e, die noch 2mal aus Me-W und dann aus An-Ä umkristallisiert wurden: 240 mg papierchromatographisch reine Kristallblättchen von e, Smp. 216-224° (Sint. ab 194°). Die Kristalle aus den Fraktionen 27-29 wurden wie die aus Fraktion 26 umkristallisiert: 220 mg Blättchen von e, Smp. 222-224° (Sint. ab 194°).

Auftrennung durch präparative Papierchromatographie: Isolierung der Monoside a, g, h, f und e. 650 mg eines Monosidgemisches, das dem in Tab. 4 gegebenen Beispiel entsprach und nach Pchr a, b, c, e, f, g und h enthielt, wurden auf 100 Bogen WHATMAN-No. 1-Papier (19 × 42 cm) im System Chf/Fmd aufgetrennt. Die Laufzeit betrug 2 1/2 Std. Es liessen sich 5 Zonen c + b, a + g, h, f und e abgrenzen, die nach dem Ausschneiden analog wie bei der Isolierung der Glykoside E und F extrahiert wurden. Die Auszüge aus den einzelnen Zonen wurden im Vakuum vom Me befreit und mit Chf erschöpfend extrahiert. Letzteres wurde mit KHCO₃-Lösung und W gewaschen und aufgearbeitet.

Die aus der (c + b)-Zone gewonnene Substanz (40 mg) wurde noch an Al₂O₃ chromatographiert, wobei sich aber keine Auftrennung erzielen liess. (Hydrolyse im Mikromaßstab und papierchromatographische Untersuchung des Geninanteils gab die beiden für Digitoxigenin (I) und Uzariogenin (III) typischen Flecke.)

Die aus der (a + g)-Zone extrahierten 160 mg wurden nochmals im präparativen Pchr auf 16 Bogen im System Chf-Bz-(2:1)/Fmd (Laufzeit 6 Std.) aufgeteilt. Aus Zone a wurden 40 mg erhalten, die nach Chromatographie an Al₂O₃ aus Me-Ä 22 mg reines Monosid a (Nadeln) vom Smp. 238-244° gaben. Aus dem aus der Zone g gewonnenen Extrakt (67 mg) liessen sich in analoger Weise 36 mg zu Büscheln vereinigte Nadeln vom Smp. 224-228° isolieren. Das reine Monosid g schmolz nach dem Umlösen aus Me-Ä bei 225-230°.

Aus der Zone h konnten 21 mg Substanz eluiert werden, die nach Pchr noch wenig f enthielten. Durch Chromatographie an Al₂O₃ liess sich eine kleine Menge des reinen Monosids h gewinnen: aus An-Ä Kristalle vom Smp. 217-227°.

Aus der Zone f wurden 48 mg gewonnen, die nach Chromatographie an Al₂O₃ 36 mg farblose Substanz gaben. Aus An-Ä 5 mg reines Monosid f, Smp. 152-156° (manchmal auch Smp. 230-235°, ohne vorher zu schmelzen).

Die aus der Zone e extrahierten 176 mg lieferten nach Chromatographie an Al₂O₃ 150 mg beinahe weisse Substanz. 30 mg wurden in Me-W gelöst, beim Wegdampfen des Me setzte Kristallisation ein: 17 mg Monosid e, feine weisse Nadelchen, Smp. 210-218°.

Verknüpfung der Monoside e und f mit den Glykosiden E und F. – a) *Fermentierung des Glykosids E.* 40 mg des durch präparative Pchr gewonnenen amorphen Glykosids E (Seite 1616) wurden mit Strophanthobiase 6 Tage fermentiert. Nach Aufarbeitung (siehe Seite 1617) wurden 15 mg Chf-lösliche Substanz und 15 mg Chf-Al-(2:1)-lösliche Anteile (nach Pchr Ausgangsmaterial) erhalten. Die Chf-lösliche Substanz zeigte im Pchr einen einzigen Fleck, dessen Rf-Wert mit demjenigen des Monosids e übereinstimmte. In der mit Chf und Chf-Al-(4:1) extrahierten wässrigen Lösung der Fermentierung konnte durch Pchr im System Bu-Py-W-(3:2:1,5) (Papier nur klimatisiert) Glucose⁴⁹⁾ nachgewiesen werden.

b) *Fermentierung des Glykosids F.* 5 mg des durch präparative Pchr gewonnenen amorphen Glykosids F (Seite 1616) wurden wie unter a) fermentiert. Erhalten: 1,5 mg Chf-Extrakt und 3,0 mg Chf-Al-(2:1)-Extrakt. Im Pchr zeigte der Chf-Extrakt neben einem kleinen Fleck, der denselben Rf-Wert wie das Monosid e hatte, einen grossen Fleck, dessen Rf-Wert demjenigen des Monosids entsprach.

Beschreibung und chemische Untersuchung der isolierten Stoffe

a) *Hydrolyse der 2-Desoxyzucker-glykoside.* – *Beispiel:* 100 mg Glykosid wurden mit 6 ml Me und 6 ml 0,1N H₂SO₄ 30 Min. unter Rückfluss erhitzt. Dann wurde im Vakuum vom Me befreit, die verbliebene wässrige Lösung 30 Min. auf 70° erwärmt, abgekühlt und 5mal mit Chf ausgeschüttelt. Die mit 2N Sodalösung und W gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Chf-Auszüge (rohes Genin enthaltend) wurden im Vakuum eingedampft.

Die mit Chf extrahierte, saure wässrige Lösung wurde im Vakuum von Chf-Resten befreit, mit frisch bereitetem und neutral gewaschenem BaCO₃ im Überschuss versetzt, aufgekocht und durch eine Schicht neutrales BaCO₃ filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum (unter pH-Kontrolle) eingedampft, der Rückstand in An (evtl. unter Zusatz von wenig Me) aufgenommen, kurz mit wenig gereinigter Aktivkohle gekocht und durch ein mit Kohle gedichtetes Filter filtriert. Nach dem Eindampfen zum Sirup wurde mit einigen Tropfen wasserfreien Lösungsmittels (z. B. An) versetzt und zur Kristallisation in die Kälte gestellt.

b) *MANNICH-SIEWERT-Spaltung der 6-Desoxyzucker-glykoside*⁵³⁾. 4 mg Substanz wurden mit 1 ml einer An-HCl-Lösung versetzt (die in 100 ml 1 ml konz. HCl enthielt), 7 Tage bei 22° im Dunkeln stehengelassen und in üblicher Weise aufgearbeitet⁵⁰⁾.

Substanz b = Evatromonosid = Digitoxigenin-digitoxosid. – Aus An-Ä-Pe feine Prismen vom Smp. 210–214°⁵¹⁾; $[\alpha]_D^{22} = -15,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,2$ in Me)⁵²⁾. Identifizierung mit Evatromonosid durch Mischprobe, Pchr und Farbreaktionen.

Diacetyl-digitoxigenin-digitoxosid. 56 mg b wurden in 0,5 ml Py und 0,45 ml (Ac)₂O acetyliert (20 Std. bei 37°). Übliche Aufarbeitung gab 67 mg Rohprodukt. Aus An-Ä 53 mg Prismen vom Smp. 215–220°; Smp. nach dem Umlösen aus An-Ä-Pe 219–222°; $[\alpha]_D^{23} = +13,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,65$ in Chf).

Hydrolyse von Substanz b. 160 mg Substanz b gaben 135 mg rohes Genin und 23 mg Zuckersirup.

Digitoxigenin (I) aus Substanz b. 135 mg rohes Genin gaben aus An-Ä 85 mg Prismen vom Smp. 235–247°; $[\alpha]_D^{22} = +17,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in Me). Identifizierung durch Mischprobe, Pchr und Farbreaktionen.

weiss: D-(+)-Digitoxose (V) aus Substanz b. Der rohe Zuckersirup (23 mg) gab aus An-Ä 8 mg Kristalle vom Smp. 101–109°; $[\alpha]_D^{22} = +35,3^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,5$ in Me). Identifizierung durch Mischprobe und Pchr⁵³⁾.

⁴⁹⁾ E. CHARGAFF, C. LEVINE & C. GREEN, J. biol. Chemistry 175, 67 (1948).

⁵⁰⁾ Vgl. z. B. Hydrolyse von Wallosid bei H. HEGEDÜS & T. REICHSTEIN, Helv. 38, 1133 (1955).

⁵¹⁾ Früher³⁰⁾ war für dieses Monosid der Smp. 181–186° bzw. 181–184° gefunden worden. Verschiedene unserer Präparate zeigten zunächst einen undeutlichen Doppel-Smp. von 199–204°/209–210°. Spätere Nachkontrollen gaben aber übereinstimmend den Smp. 210–214°. Auf unserem KOFLER-Block zeigte das authentische Evatromonosid (KAISER), das wir Herrn Prof. T. REICHSTEIN verdanken, den Smp. 199–210°.

⁵²⁾ TSCHESCHE & Mitarb.³⁰⁾ fanden $[\alpha]_D = -14,6^\circ$ (in Me).

⁵³⁾ O. RENKONEN & O. SCHINDLER, Helv. 39, 1490 (1956).

Substanz c = Uzarigenin-digitoxosid. – Aus An-Ä feine Nadeln vom Smp. 241–244°; $[\alpha]_D^{25} = -17,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in Me).

$C_{29}H_{44}O_7$ (504,64) Ber. C 69,02 H 8,79 O 22,19% Gef. C 68,56 H 8,64 O 22,23%

Diacetyl-uzarigenin-digitoxosid. 54 mg c gaben 56 mg rohes Acetylierungsprodukt. Aus Me-Ä feine Nadeln vom Smp. 248–253°. Nach dem Umlösen aus Chf-Ä verfilzte Nadeln vom Smp. 250–253°; $[\alpha]_D^{25} = +7,9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,0$ in Chf).

Hydrolyse von Substanz c. 300 mg c gaben 242 mg rohes Genin und 55 mg rohen Zuckersirup.

Uzarigenin (III) aus Substanz c. 242 mg rohes Genin gaben aus Me-Ä prismatische Nadeln vom Smp. 230–249°. Nach dem Umlösen stieg der Smp. auf 230–255°; $[\alpha]_D^{25} = +14,3^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,9$ in Me). Identifizierung durch Mischprobe, Pchr, IR.-Spektrum und Farbreaktionen.

Acetyluzarigenin (IV). 20 mg Uzarigenin vom Smp. 230–255° aus Substanz c gaben 21 mg rohes Acetylierungsprodukt. Aus Me 13 mg Prismen vom Smp. 258–268°; $[\alpha]_D^{25} = +3,8^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,9$ in Chf). Das Präparat war nach Mischprobe und Farbreaktionen identisch mit Acetyluzarigenin (IV).

D-(+)-Digitoxose (V) aus Substanz c. Der rohe Zuckersirup (55 mg) gab aus An-Ä nach Animpfen 25 mg Nadeln vom Smp. 104–109°. Nach dem Umlösen aus An stieg der Smp. auf 105–109°; $[\alpha]_D^{25} = +36,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,06$ in Me). Identifizierung durch Mischprobe und Pchr⁵⁸).

Substanz a = Uzarigenin-2-desoxyglykosid. – Aus Me-Ä feine Nadeln vom Smp. 241–244°; $[\alpha]_D^{25} = -29,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in Me). Zur Analyse wurde 7 Std. bei 120° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_{29}H_{44}O_7$ (504,64) Ber. C 69,02 H 8,79%⁵⁴ Gef. C 69,19 H 8,99%

Diacetyl-uzarigenin-2-desoxyglykosid. 53 mg a gaben 57 mg Acetylierungsprodukt. Aus Me-Ä 30 mg feine Nadeln vom Smp. 260–268°. Nach dem Umkristallisieren stieg der Smp. auf 267–273°; $[\alpha]_D^{25} = -15,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in Chf).

Hydrolyse von Substanz a. 235 mg Substanz a wurden hydrolysiert und gaben 180 mg rohes Genin und 50 mg rohen Zuckersirup.

Uzarigenin (III) aus Substanz a. Die 180 mg rohes Genin gaben aus Me-Ä 138 mg Prismen vom Smp. 232–249°; $[\alpha]_D^{25} = +14,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,2$ in Me). Identifizierung durch Mischprobe, Pchr, IR.-Spektrum und Farbreaktionen.

Acetyluzarigenin (IV). 20 mg Uzarigenin aus Substanz a gaben 20 mg Acetylierungsprodukt. Aus Me-Ä Prismen vom Smp. 255–265°; $[\alpha]_D^{25} = +3,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in Chf). Nach Mischprobe und Farbreaktionen identisch mit Acetyluzarigenin (IV).

Roher Zucker aus Substanz a. Der farblose Zuckersirup (50 mg) zeigte in den 4 Systemen To-Bu-(4:1)/W (48 Std.), Mäk-To-(2:1)/W (42 Std.), Mäk/H₃BO₃-Na₂B₄O₇-Puffer (18 Std.) und Mäk/W (50 Std.) gleiche Rf-Werte wie Boivinose, konnte aber auch nach dem Animpfen mit diesem Zucker³¹ nicht kristallisiert werden. Destillation bei 0,04 Torr und 70° gab 35 mg farbloses Destillat; $[\alpha]_D^{25} = +49,5^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,90$ in An). Der im Molekularkolben verbliebene Rückstand wog 12 mg; $[\alpha]_D^{25} = +49,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in An).

Substanz g = Digitoxigenin-gulomethylosid (?) (= Digitoxigenin-antiarosid (?)). – Aus Me-Ä zu Drusen vereinigte Nadeln vom Smp. 225–230°; $[\alpha]_D^{25} = -5,2^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,8$ in Chf) bzw. $[\alpha]_D^{25} = -9,9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,8$ in Me). Zur Analyse wurde 7 Std. bei 110° und 0,02 Torr getrocknet (Schweinchen). Kein Gewichtsverlust. Einwaage nur 1,7 mg!

$C_{29}H_{44}O_8$ (520,64) Ber. C 66,89 H 8,52% Gef. C 67,26 H 8,99%

*MANNICH-SIEWERT-Spaltung*³³ von Substanz g. Aus 3 mg g wurden nach üblicher Aufarbeitung⁵⁰ 2,5 mg in Chf lösliche Anteile und 0,3 mg roher Zuckersirup erhalten. – Das rohe Genin gab im Pchr (System Bz-Chf-(3:2)/Fmd) einen Hauptfleck mit gleicher Laufstrecke wie Digitoxigenin. Daneben waren kleinere Flecke (Anhydroprodukte und Ausgangsmaterial) eben noch sichtbar. – Der rohe Zuckersirup zeigte im Pchr (in den Systemen Mäk/W und Bu-Mäk-(1:1)/H₃BO₃-Na₂B₄O₇-Puffer) die gleiche Laufstrecke wie Gulomethylose (= Antiarose).

Substanz h. – Aus Me-Ä Kristalle vom Smp. 217–227°. KELLER-KILIANI-Reaktion auf 2-Desoxyzucker positiv. Hydrolyse von 1 mg gab 0,7 mg Genin und 0,2 mg rohen Zuckersirup. Das

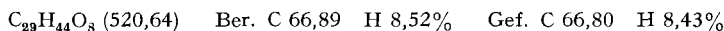
⁵⁴) Berechnet auf ein Uzarigenin-2-desoxymethylpentosid.

rohe Genin zeigte im Pchr einen einzigen Fleck mit kleinerem Rf-Wert als Digitoxigenin bzw. Uzarigenin. Der rohe Zuckersirup verhielt sich im Pchr (System Mäk-To-(2:1)/W) gleich wie Boivinose bzw. wie der 2-Desoxyzucker aus Substanz a.

Substanz f = Digitoxigenin-allomethylosid (?). – Dieses Monosid lässt sich nur schlecht kristallisieren. Aus An-Ä wurden körnige Kristalle vom Smp. 152–156° erhalten, die manchmal auch erst bei 230–235° schmolzen; $[\alpha]_D^{25} = -11,6^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,70$ in Me).

MANNICH-SIEWERT-Spaltung von Substanz f. Aus 4 mg papierchromatographisch einheitlicher ML von f wurden 3,3 mg Aglykon und 0,5 mg roher Zuckersirup erhalten. Das rohe Genin gab im Pchr (System Bz-Chf-(3:2)/Fmd) neben kaum sichtbaren Flecken (Ausgangsmaterial und Anhydroprodukte) einen sehr deutlichen Fleck mit einem Rf-Wert wie Digitoxigenin. – Der rohe Zuckersirup gab im Pchr einen Fleck (Systeme Mäk/W und Bu-Mäk-(1:1)/H₃BO₃-Na₂B₄O₇-Puffer) mit gleichem Rf-Wert wie Allomethylose.

Substanz e = Digitoxigenin-glucomethylosid. – Aus Me-W (durch Abdampfen des Me bis zum Erscheinen der ersten Kristalle) Nadeln vom Smp. 210–218°. Ein durch 2–3maliges Umkristallisieren aus Me-W gereinigtes Präparat konnte dann auch aus An-Ä kristallisiert werden: Blättchen vom Smp. 222–224°; $[\alpha]_D^{25} = -11,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,47$ in Me).



Triacetyl-digitoxigenin-glucomethylosid. 60 mg Substanz e gaben 74 mg rohes Acetylierungsprodukt. Aus An-Ä-Pe 61 mg Blättchen vom Smp. 232–246°; $[\alpha]_D^{25} = -1,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,40$ in Chf).

MANNICH-SIEWERT-Spaltung der Substanz e. Aus 100 mg e wurden 88 mg Genin und 12 mg roher Zuckersirup erhalten.

Digitoxigenin aus Substanz e. Die 88 mg Chf-löslichen Anteile aus obiger Hydrolyse wurden an 2,5 g neutralem Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Bz-Chf-(4:1) und -(3:2) eluierte Substanz gab aus An-Ä 23 mg Kristalle vom Smp. 248–255°; $[\alpha]_D^{25} = +15,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,3$ in Me). Identifizierung durch Mischprobe und Pchr. Das Acetylderivat gab aus An-Ä gut ausgebildete Prismen vom Smp. 220–227°, die durch Mischprobe und Farbreaktionen als *Acetyldigitoxigenin (II)* identifiziert wurden.

D-Glucomethylose (IX) aus Substanz e. Der farblose Zuckersirup aus e gab nach Animpfen mit D-(+)-Glucomethylose 4,5 mg körnige Kristalle vom Smp. 139–146°; $[\alpha]_D^{25} = +55,5^\circ \pm 5^\circ$ ($c = 0,3$ in W [Anfangswert], bzw. + 29,9° [Endwert] nach 16 Std.). Identifizierung durch Mischprobe und Pchr (System Bu-Mäk-(1:1)/H₃BO₃-Na₂B₄O₇-Puffer und Mäk/W).

ZUSAMMENFASSUNG

Ein aus getrockneten Blättern von *Digitalis isabelliana* bereiteter wässriger Auszug wurde jeweils erschöpfend mit Äther, Chloroform, Chloroform-Alkohol-(4:1), Chloroform-Alkohol-(2:1) und Chloroform-Alkohol-(3:2) extrahiert. Dabei ergab sich, dass die herzwirksamen Substanzen grösstenteils mit Chloroform-Alkohol-(4:1) (in der Hauptsache wohl als Diglykoside) ausgeschüttelt werden können. Die Untersuchung dieser Fraktion ist Gegenstand vorliegender Arbeit.

Da eine Aufteilung des «genuinen» Glykosidgemisches nur sehr unvollständig gelang, wurde ein partieller Abbau mit Strophanthobiase (zur Abspaltung der endständigen Glucose) durchgeführt. Das dabei erhaltene Glykosidgemisch liess sich in 7 kristallisierte Monoside, die als a, b, c, e, f, g und h bezeichnet werden, auftrennen. Von diesen erwies sich nur b als bekannte Substanz (= Evatromonosid). c und e konnten als Uzarigenin-digitoxosid bzw. als Digitoxigenin-glucomethylosid aufgeklärt werden. D-(+)-Glucomethylose ist damit zum ersten Mal in einem Herzgift aufgefunden worden. a ist ein Uzarigenin-2-desoxosid, dessen Zuckerkomponente bisher nicht identifiziert werden konnte. g und f sind vermutlich Digitoxigenin-glucomethylosid

bzw. Digitoxigenin-allomethylosid. Die Konstitution des Monosids h ist noch völlig ungeklärt.

Das von GONZÁLEZ *et al.* auf papierchromatographischem Wege nachgewiesene Xysmalogenin konnte hier nicht aufgefunden werden.

Bemerkenswert ist der hohe Glykosidgehalt der *D. isabelliana*. Dieser kann auf etwa 5% (bezogen auf das getrocknete Blatt) veranschlagt werden. Damit findet die früher festgestellte auffallend hohe Toxizität dieser Droge ihre chemische Erklärung.

Pharmazeutisches Institut der Universität Basel,
 Instituto Canario de Medicina Regional,
 Las Palmas de Gran Canaria, und
 Forschungslaboratorien der
 F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

198. Über die Synthese von Phosphamidon und seinen Abbau in Pflanzen

von R. Anliker, E. Beriger, M. Geiger und K. Schmid

(28. VII. 61)

Im Hinblick auf die grosse Bedeutung der Phosphorsäureester im Pflanzenschutz¹⁾ erweckte eine Gruppe von phosphororganischen Verbindungen, welche bei der Umsetzung von Trialkylphosphiten mit in α -Stellung halogenierten Aldehyden, Ketonen, Ketocarbonsäureestern, Ketocarbonsäureamiden und Carbonsäureestern entstehen, unser spezielles Interesse.

Bekanntlich verläuft die Umsetzung von Trialkylphosphiten mit Alkylhalogeniden nach dem Schema einer MICHAELIS-ARBUSOV'schen Reaktion²⁾ unter Bildung von Phosphonaten. In Analogie zu diesem Verlauf der Reaktion nahm man vorerst an, dass sich auch α -Halogen-Ketone und -Ester³⁾ in gleicher Weise zu Phosphonaten umsetzen. PERKOW⁴⁾ und anderen Forschern³⁾ gelang es in der Folge zu zeigen, dass diese Umsetzung in der Hauptreaktion zu Vinylphosphaten⁵⁾ der allgemeinen Struktur I führt.

Bei unseren Untersuchungen sind wir auf eine ganze Reihe von insektizid hochaktiven Vinylphosphaten gestossen. So führte die Umsetzung von Trimethylphosphit

1) R. L. METCALF, Bull. entomol. Soc. Amer. 5, 3 (1959); G. SCHRADER, Entwicklung neuer Insektizide auf der Grundlage organischer Fluor- und Phosphorverbindungen, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1952; H. GYSIN, Chimia 8, 205, 221 (1954).

2) A. MICHAELIS & TH. BECKER, Ber. deutsch. chem. Ges. 30, 1003 (1897); A. E. ARBUSOV, Ж 38, 687 (1906).

3) Vgl. zusammenfassende Darstellung J. F. ALLEN & O. H. JOHNSON, J. Amer. chem. Soc. 77, 2871 (1955).

4) W. PERKOW, K. ULLERICH & F. MEYER, Naturwissenschaften 39, 353 (1952); W. PERKOW, Chem. Ber. 87, 755 (1954).

5) Vgl. dazu 3) sowie A. R. STILES, U.S. Pat. 2685552 (1954); A. J. SPEZIALE & R. C. FREEMAN, J. org. Chemistry 23, 1883 (1958); F. C. CRAMER & K. G. GÄRTNER, Chem. Ber. 91, 704 (1958).