

Die Mikroanalysen wurden in verdankenswerter Weise im analytischen Laboratorium des Zürcher Institutes unter der Leitung von Herrn H. FROHOFFER ausgeführt; die DEBYE-SCHERRER-Diagramme wurden von Herrn Dr. R. MÜLLER und die IR.-Spektren von Herrn Dr. E. GANZ in den Physik-Laboratorien der CIBA AG. aufgenommen, wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken möchten.

## SUMMARY

Cyclisation of active esters<sup>3)</sup> of the racemic tripeptides glycyl-glycyl-DL-phenylalanine and glycyl-DL-phenylalanyl-glycine as well as of the hexapeptide glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycyl-glycyl-DL-phenylalanine (unidentified mixture of diastereoisomers) has yielded as main product the *meso*-cyclohexapeptide, cyclo-glycyl-L-phenylalanyl-glycyl-glycyl-D-phenylalanyl-glycyl (IV)<sup>5)</sup>. This is proven by comparison of the X-ray powder diagram of the said product with those of the corresponding *meso*, L-L, D-D, and racemic cyclohexapeptides (Fig. 1). The synthesis of these isomers by the azide procedure<sup>6)</sup> is described. The hydrazide function was introduced in a protected form<sup>7)</sup> early in the synthesis (as -NHNH·CO·OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) and the blocking group (*t*-butoxy-carbonyl) removed in one of the last steps (schemes 2 and 3).

The reported reactions constitute the first observation of stereospecific cyclisation in the peptide field. Obviously, in our case, a D-tripeptide reacts preferentially with an L-tripeptide, and *vice versa*.

Models for the conformation of cyclohexapeptides are discussed: that proposed by SCHWYZER (Fig. 3)<sup>18)</sup> allows construction of the optically active as well as of the *meso*-cyclohexapeptides on the same basic ring structure, and is supported by IR. data.

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich,  
und  
Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel  
Pharmazeutische Abteilung

## 102. Zur Struktur der Zuckerkomponente des Digitoxins

47. Mitteilung über Herzglykoside<sup>1)</sup>

von H. Lichti, M. Kuhn und A. von Wartburg

(6. III. 62)

Im Zusammenhang mit der kürzlich beschriebenen Konstitutionsermittlung der Digilanidobiose<sup>1)</sup> und neuen Untersuchungen über die isomeren Acetyldigitoxine<sup>2)</sup> interessierte uns die exakte Struktur der Zuckerkomponente des Digitoxins. Obschon das therapeutisch wichtige Digitoxin eines der ältesten Reinglykoside aus Digitalisarten darstellt<sup>3)</sup>, erschienen erst in den letzten Jahren experimentelle Arbeiten, die sich speziell mit dem Bau seines Zuckerteils befassten. Digitoxin zerfällt bekanntlich

<sup>1)</sup> 46. Mitt.: H. LICHTI & A. VON WARTBURG, *Helv.* **44**, 238 (1961).

<sup>2)</sup> Vgl. folgende Mitteilung, *Helv.* **45**, 881 (1962).

<sup>3)</sup> Ältere Literatur über Digitoxin siehe z. B. bei A. STOLL & J. RENZ, *Verh. naturforsch. Ges. Basel* **67**, 392 (1956).

durch saure Hydrolyse in Digitoxigenin und drei Mol D-Digitoxose<sup>4)</sup>. Unter sehr milden Bedingungen kann auch ein schrittweiser Abbau zu Digitoxigenin-bis-digitoxosid und Digitoxigenin-mono-digitoxosid erfolgen<sup>5)</sup>. Als Bauprinzip für den Tri-saccharidrest des Digitoxins kommen eine lineare oder eine verzweigte Anordnung der drei Digitoxose-Einheiten in Betracht. Auf Grund verschiedener Beobachtungen bei der enzymatischen und bei der sauren Spaltung vermuteten STOLL, KREIS und RENZ in den Lanatosiden und in ihren Desacetyl- und Desgluco-Derivaten das Vorliegen einer linearen Zuckerkette<sup>6)</sup>. Für diese Annahme lieferten später GREGG & GISVOLD<sup>7)</sup> mit der Perjodat-Benzidin-Reaktion auf Papier einen entscheidenden experimentellen Beitrag. Der auf *cis*-1,2-Glykole spezifische Test fiel bei den isomeren Acetyldigitoxinen und bei den Lanatosiden A und C negativ aus. Digitoxin, Gitoxin und Digoxin hingegen reagierten positiv. Diese Befunde sprachen für die lineare Anordnung der Zucker in den geprüften Digitalisglykosiden<sup>8)</sup> und zeigten, dass die im Digitoxin endständige Digitoxose eine *cis*-Glykolgruppe enthält, d. h. als Pyranose vorliegen muss<sup>9)</sup>. Da der Perjodat-Test bei Digitoxigenin-mono- und -bis-digitoxosid positiv ausfiel, waren auch bei den übrigen Digitoxose-Einheiten des Digitoxins Pyranoseformen wahrscheinlich<sup>10)</sup>. Noch unbestimmt war die Verknüpfung der einzelnen Digitoxosen untereinander; es sind sowohl 1,4- als auch 1,3-Bindungen möglich. Die wahrscheinlichere 1,4-Verknüpfung wurde kürzlich mit Hilfe der Methylierungsmethode abzuleiten versucht. So konnten TSCHESCHE und Mitarbeiter<sup>10)</sup> bei der Hydrolyse von permethyliertem Digitoxin papierchromatographisch eine Dimethyldigitoxose (vermutlich die 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose), Cymarose und in geringen Mengen freie Digitoxose als Spaltstücke nachweisen<sup>11)</sup>. Die allerdings noch unbekannt 4-O-Methyl-D-digitoxose («Isocymarose») konnte nicht unter den Hydrolyseprodukten entdeckt werden, folglich sollte eine 1,3-Bindung ausscheiden. Das störende Auftreten der Digitoxose wurde auf unvollständige Methylierung des Digitoxins zurückgeführt<sup>12)</sup>.

Für die in der nächsten Mitteilung<sup>2)</sup> beschriebene Lagebestimmung der Acetylgruppe in den Acetyldigitoxinen bedeutete die sichere Kenntnis der Zuckerstruktur im Digitoxin eine wesentliche Voraussetzung. Wir versuchten deshalb die vorwiegend papierchromatographisch gewonnenen Befunde von GISVOLD<sup>7)</sup> und TSCHESCHE<sup>10)</sup> durch präparative Versuche zu ergänzen und quantitative Angaben über die aus permethyliertem Digitoxin erhältlichen Hydrolyseprodukte zu gewinnen. Im Verlauf

<sup>4)</sup> A. WINDAUS & C. FREESE, Ber. deutsch. chem. Ges. 58, 2503 (1925); A. WINDAUS & G. STEIN, *ibid.* 61, 2436 (1928).

<sup>5)</sup> F. KAISER, E. HAACK & H. SPINGLER, Liebigs Ann. Chem. 603, 75 (1957).

<sup>6)</sup> A. STOLL & W. KREIS, Helv. 16, 1049 (1933); A. STOLL & J. RENZ, Enzymologia 7, 362 (1939), und spätere Arbeiten.

<sup>7)</sup> D. H. GREGG & O. GISVOLD, J. Amer. pharmac. Assoc. 43, 106 (1954).

<sup>8)</sup> Diese Arbeitshypothese setzt pyranoiden Strukturen voraus. Bei Annahme einer furanoiden Digitoxose wäre eine verzweigte Zuckerkette denkbar.

<sup>9)</sup> Die Pyranoseform der endständigen Digitoxose ist inzwischen durch die Konstitutionsermittlung der Digilanidobiose<sup>1)</sup> bestätigt worden.

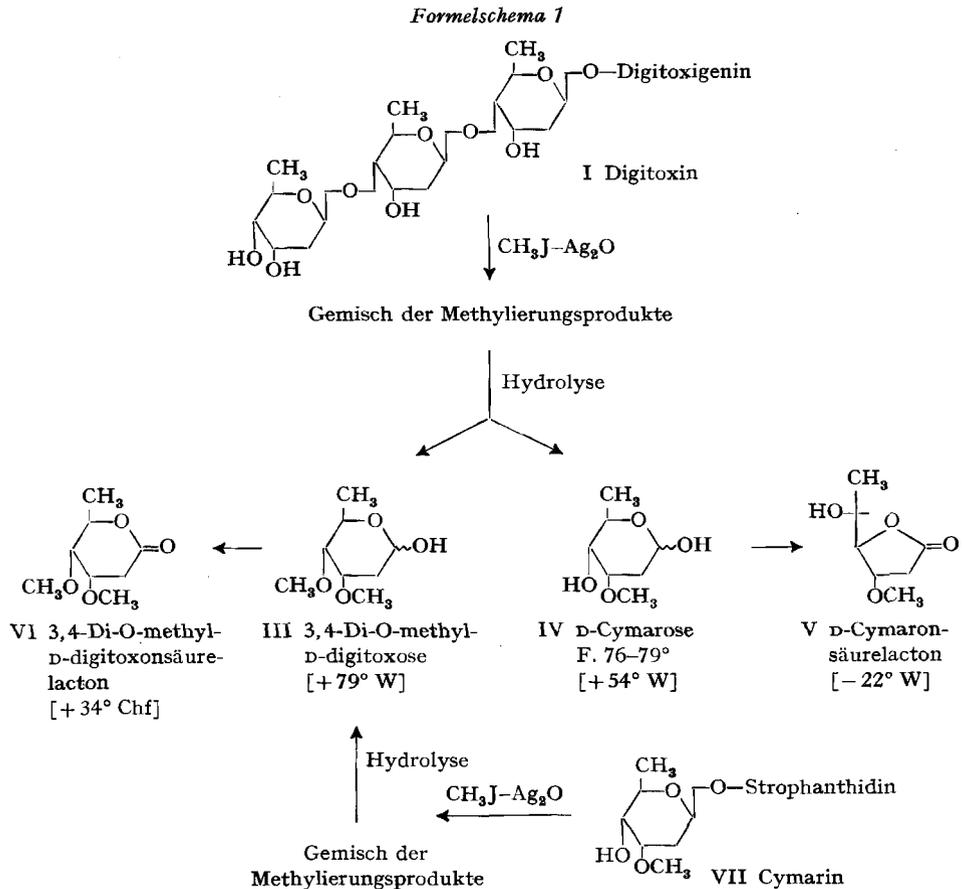
<sup>10)</sup> R. TSCHESCHE, B. NIYOMPORN & H. MACHLEIDT, Chem. Ber. 92, 2258 (1959).

<sup>11)</sup> Die gleichen Spaltstücke wurden auch bei der Hydrolyse der Permethylderivate von Gitoxin, Digoxin, Acetyldigitoxin- $\alpha$  und - $\beta$  papierchromatographisch nachgewiesen. Aus Permethyldigoxin liess sich D-Cymarose in kristallisierter Form fassen<sup>10)</sup>.

<sup>12)</sup> Bei einer verzweigten Zuckeranordnung wäre als Spaltprodukt Digitoxose zu erwarten.

unserer Arbeiten zeigte sich, dass bei der Methylierung von Cardenolidglykosiden unübersichtliche Nebenreaktionen auftraten; es erschien deshalb wünschenswert, die Zuckerstruktur des Digitoxins auf einem unabhängigen Wege zu ermitteln.

Zur Permethylierung des Digitoxins benutzten wir die von R. KUHN *et al.*<sup>13)</sup> angegebene Methode mit Methyljodid und Silberoxid in Dimethylformamid, wobei ein amorphes Präparat anfiel, das frei von Stickstoff und Halogen war und einen mittleren



Die Zahlen in eckigen Klammern geben die spez. Drehwerte für Na-Licht an. Chf = Chloroform, W = Wasser

Gehalt von 4,5  $\text{CH}_3\text{O}$ -Gruppen aufwies. Dieser Wert konnte durch Nachmethylieren nicht erhöht werden. Entsprechend den Dünnschicht- und Papierchromatogrammen setzte sich das Reaktionsprodukt aus 3–4 Hauptkomponenten zusammen, die in den üblichen Lösungsmittelsystemen sehr ähnliche  $R_f$ -Werte besaßen. Bemerkenswert war der negative Ausfall der für den Butenolidring charakteristischen RAYMOND-

<sup>13)</sup> R. KUHN, H. TRISCHMANN & I. LÖW, *Angew. Chem.* 67, 32 (1955). Diese Methode wurde schon mehrfach zur Methylierung von Zuckern aus Herzglykosiden benützt: R. TSCHESCHE *et al.*<sup>10)</sup>; H. LICHTI & A. VON WARTBURG, *Helv.* 43, 1666 (1960); 44, 238 (1961).

Reaktion<sup>14</sup>) und das Fehlen der typischen Absorptionsbanden im UV.- und IR.-Spektrum. Bei der Methylierung des Digitoxins war demnach neben den Zuckershydroxylen auch der  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Lacton-Fünfring in noch unübersichtlicher Weise angegriffen worden. Orientierende Versuche zur Isolierung eines definierten Methyl-digitoxins verliefen erfolglos, und wir waren gezwungen, die hydrolytische Spaltung mit dem rohen Gemisch der Methylierungsprodukte durchzuführen. Die nach Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure in Aceton erhaltenen Hydrolyseprodukte (Formelschema 1) liessen sich durch Verteilung zwischen Äther und Wasser in eine Aglykonfraktion und eine wasserlösliche Zuckerfraktion auftrennen. Die amorphen Neutralstoffe des Aglykanteils ergaben mit RAYMOND-Reagens keine Färbung; auf eine eingehendere Untersuchung wurde verzichtet. Die Zucker zeigten im Dünnschichtchromatogramm zwei dominierende Flecke und drei sehr schwach sichtbare Nebenflecke; freie Digitoxose konnten wir nicht nachweisen<sup>10</sup>). Die präparative Trennung erfolgte durch Chromatographie an neutralem Aluminiumoxid. Mit Benzol-Methylenchlorid liess sich die weniger polare Komponente eluieren; nach Destillation im Hochvakuum lag ein einheitlicher, farbloser Sirup vor. Das Präparat besass die Zusammensetzung  $C_8H_{16}O_4$  (mit 2  $CH_3O$ -Gruppen) und zeigte in Wasser  $[\alpha]_D^{22} = +79^\circ$ . Es handelte sich um die erwartete 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose (III) aus der endständigen, pyranoiden Digitoxose des Digitoxins. Die zweite Hauptkomponente haftete sehr stark am Adsorbens und liess sich erst mit Methylenchlorid-Methanol-Gemischen ablösen. Die vereinigten Eluate kristallisierten in farblosen Rosetten vom Smp.  $76-79^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{22} = +54^\circ$  (in Wasser), und erwiesen sich beim Vergleich der IR.-Spektren und der Rf-Werte als reine D-Cymarose (IV). Die Identifizierung der beiden Hydrolyseprodukte III und IV ergänzten wir durch folgende Umsetzungen: Bromwasser oxydierte das Cymarosepräparat IV zum Lacton V; dieses wies im IR.-Spektrum bei  $1770\text{ cm}^{-1}$  die typische Bande eines  $\gamma$ -Lactons auf und liess sich mit Phenylhydrazin in ein kristallisiertes Hydrazid überführen. Diese beiden Derivate stimmten in allen Eigenschaften mit D-Cymaronsäurelacton (V)<sup>15</sup>), bzw. D-Cymaronsäure-phenylhydrazid<sup>16</sup>) überein. Die 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose (III) ist unseres Wissens bisher nicht in Substanz gefasst worden<sup>16</sup>). Als Derivat der flüssigen Dimethyl-digitoxose eignete sich das  $p$ -Nitrobesylhydrazon,  $C_{14}H_{21}O_7N_3S$ , vom Smp.  $127-129^\circ$ . Zum Beweis der pyranoiden Ringstruktur wurde III mit Bromwasser zu einem Lacton oxydiert, das die für  $\delta$ -Lactone typische IR.-Absorptionsbande bei  $1735\text{ cm}^{-1}$  besass und im Drehwert ( $[\alpha]_D^{23} = +34^\circ$  in Chloroform)<sup>17</sup>) dem bereits von ELDERFIELD<sup>15</sup>) beschriebenen 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxonsäurelacton (VI) entsprach.

Die 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose sollte sich auch durch Hydrolyse von permethyliertem Cymarin gewinnen lassen, da der Zuckerteil dieses Strophanthus-

<sup>14</sup>) W. D. RAYMOND, *Analyst* 63, 478 (1938). Literaturzusammenstellung über Farbreaktionen des Lacton-Fünfrings siehe bei R. BERNASCONI, H. P. SIGG & T. REICHSTEIN, *Helv.* 38, 1767 (1955), oder L. ROSENTHALER, *Pharmazie* 15, 405 (1960).

<sup>15</sup>) R. C. ELDERFIELD, *J. Biol. Chem.* 111, 527 (1935).

<sup>16</sup>) 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose wurde lediglich papierchromatographisch nachgewiesen und durch Rf-Werte charakterisiert<sup>10</sup>).

<sup>17</sup>) Das furanoide 3,5-Di-O-methyl-D-digitoxonsäurelacton besitzt nach ELDERFIELD<sup>15</sup>) die negative Drehung  $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$  (in Chloroform).

Glykosids ebenfalls pyranoid vorliegt<sup>18)</sup>. Wie beim Digitoxin verlief die Methylierung von Cymar in (VII) uneinheitlich und lieferte ein Gemisch RAYMOND-negativer Methyl-derivate. Die saure Hydrolyse ergab methylierte Aglykone und ein Zuckerspaltstück, das in der optischen Drehung, im IR.-Spektrum (Fig. 1) und in den Rf-Werten mit der aus Digitoxin gewonnenen 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose (III) identisch war.

Bei der präparativen Hydrolyse von permethyliertem Digitoxin isolierten wir 72% d. Th. 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose (entspr. ca. 1 Mol.) und 60% d. Th. reine D-Cymarose (entspr. ca. 2 Mol.)<sup>19)</sup>. Die Ausbeuten und die sichere Identifizierung dieser zwei Spaltstücke schliessen eine 1,3-Bindung der Zucker im Digitoxin aus; wir

IR.-Absorptionsspektren<sup>20)</sup>

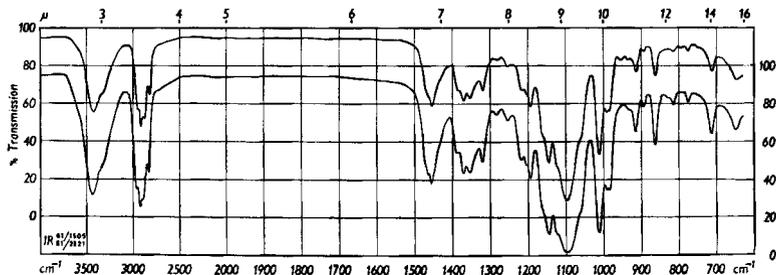


Fig. 1. 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose (III), flüssig  
obere Kurve: aus permethyliertem Digitoxin  
untere Kurve: aus permethyliertem Cymar in

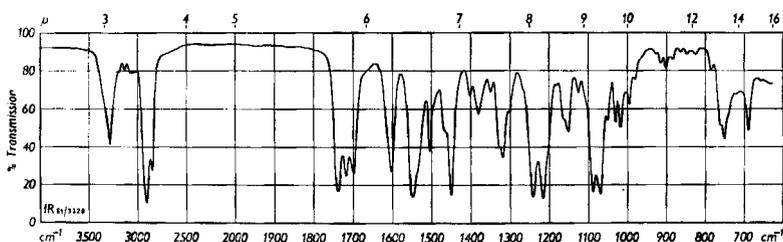


Fig. 2.  $\beta$ -Methyl-D-digitoxosid-3,4-bis-phenylurethan (X) in Nujol

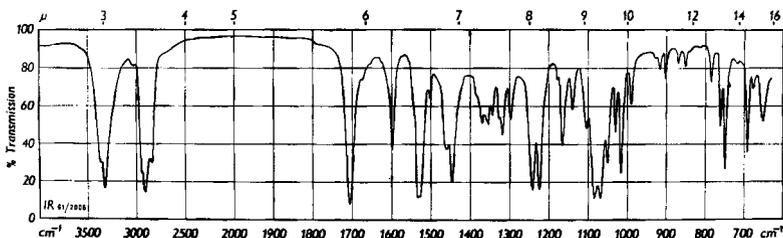


Fig. 3. D-Digitoxose-3-phenylurethan (XV) in Nujol

<sup>18)</sup> Die Pyranosidform der D-Cymarose im Cymar in geht aus der Struktur der Strophanthobiose hervor<sup>2)</sup>.

<sup>19)</sup> Die Ausbeuten wurden auf Digitoxin berechnet, wobei 5,00 g Digitoxin 5,72 g Permethylierungsprodukt entsprachen.

<sup>20)</sup> Alle IR.-Spektren wurden auf einem PERKIN-ELMER-IR.-Spektrophotometer, Mod. 21, aufgenommen.

gelangten damit zum gleichen Resultat wie TSCHESCHE *et al.*<sup>10</sup>). Die mit der Permethylierungsmethode gewonnenen Ergebnisse über den Bau des Digitoxins sind jedoch insofern mit einer gewissen Unsicherheit verbunden, als wir bei der hydrolytischen Spaltung von einem in seiner Zusammensetzung nicht genau bekannten Gemisch von Permethylierungsprodukten des Digitoxins ausgingen. Es schien daher angezeigt, die postulierte Konstitution des Digitoxins (I) durch weitere Reaktionen zu überprüfen.

In der Folge versuchten wir, die freien Zuckerhydroxyle im Digitoxin durch Einführen des Phenylcarbonylrests zu blockieren. Spaltung des Urethanderivats und Charakterisierung der Zerfallsprodukte sollten einen weiteren Einblick in die Zuckerstruktur des Digitoxins ermöglichen. Die Urethane von Zuckern und Glykosiden sind schon mehrfach bei Strukturaufklärungen von Kohlehydraten als Zwischenprodukte herangezogen worden<sup>21</sup>).

Digitoxin reagierte mit Phenylisocyanat zum einheitlichen und kristallisierten Tetraphenylurethan VIII vom Smp. 186–189°,  $[\alpha]_D^{20} = +103^\circ$  (in Chloroform). Wie aus Spektren und Farbreaktionen hervorging, war der Butenolidring unversehrt geblieben. Durch Methanolyse zerfiel Digitoxin-tetraphenylurethan in Digitoxigenin und sechs verschiedene Zuckerbruchstücke (Formelschema 2), die sich im Dünnschichtchromatogramm durch Rf-Werte und unterschiedliche Anfärbbarkeit mit Antimontrichlorid deutlich voneinander abgrenzen liessen. Nach abnehmenden Rf-Werten geordnet traten folgende Stoffe auf: Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Methyl-D-digitoxosid-3,4-bis-phenylurethan (IX und X),  $\beta$ -Methyl-D-digitoxofuranosid-3-phenylurethan (XI),  $\alpha$ -Methyl-D-digitoxofuranosid-3-phenylurethan (XII),  $\alpha$ -Methyl-D-digitoxopyranosid-3-phenylurethan (XIII), Digitoxigenin und  $\beta$ -Methyl-D-digitoxopyranosid-3-phenylurethan (XIV). Die Identifizierung der Spaltprodukte erfolgte durch Vergleich mit Präparaten, die wir beim Abbau der Tris-phenylurethane aus den isomeren Acetyldigitoxinen isoliert hatten<sup>2)</sup>. Zur präparativen Aufarbeitung wurde das Gemisch der Methanolyseprodukte mit abs. Äther digeriert; dabei blieb Digitoxigenin ungelöst. Die ätherlöslichen Zuckerderivate chromatographierten wir an Aluminiumoxid. Pentan-Benzol eluierte das Bis-phenylurethan-Derivat in Form seiner anomeren Methylglykoside (IX und X); durch mehrmaliges Kristallisieren liess sich aus dem Anomerengemisch reines  $\beta$ -Methyl-D-digitoxosid-3,4-bis-phenylurethan (X) vom Smp. 107–111° isolieren. Auf die Gewinnung des  $\alpha$ -Anomeren (IX)<sup>2)</sup> wurde hier verzichtet. Die späteren, mit Chloroform und Chloroform-Methanol ausgewaschenen Fraktionen setzten sich aus den vier isomeren Monophenylurethanen (XI–XIV) zusammen. Dieses Gemisch wurde direkt mit 0,1N Schwefelsäure in Aceton zu D-Digitoxose-3-phenylurethan (XV) hydrolysiert. Das Präparat XV schmolz bei 125–128° und zeigte eine geringe Mutarotation:  $[\alpha]_D^{20} = +52,4^\circ \rightarrow +64,4^\circ$  (in 95-proz. Pyridin).

Die Spaltung des Digitoxin-tetraphenylurethans (VIII) lieferte rund 1 Mol. (83%) Digitoxigenin, 1 Mol. (83%) Methyl-D-digitoxosid-3,4-bis-phenylurethan (in Form der Anomeren IX und X) und 2 Mol. (63%) D-Digitoxose-3-phenylurethan (XV).

<sup>21</sup>) M. R. SALMON & G. POWELL, *J. Amer. Chem. Soc.* 67, 3507 (1939); W. M. HEARON, G. D. HIATT & C. R. FORDYCE, *ibid.* 66, 995 (1944); H. BREDERECK, A. WAGNER, G. FABER, G. IMMEL & H. KREISELMEIER, *Chem. Ber.* 91, 2819 (1958); H. BREDERECK, H. ZINNER, A. WAGNER, G. FABER, W. GREINER & W. HUBER, *ibid.* 91, 2824 (1958); vgl. auch die folgende Mitteilung<sup>2)</sup>.



Die den beiden wichtigsten Abbauprodukten X und XV zuerteilten Formeln stützen sich auf folgende Ableitungen: Für das Bis-phenylurethan X ist die pyranoide Ringstruktur höchst wahrscheinlich, da das Derivat aus der endständigen Digitoxose des Digitoxins stammen muss und für diese Zuckereinheit der Pyranosering gut begründet ist<sup>1) 7)</sup>. Über einen ergänzenden Konstitutionsbeweis durch Partialsynthese von X berichten wir in der folgenden Mitteilung<sup>2)</sup>. Die  $\beta$ -Orientierung der Methoxygruppe folgt aus dem Drehwert des Bis-phenylurethans X ( $[\alpha]_D^{20} = +108^\circ$  in 95-proz. Pyridin), der um mehr als  $100^\circ$  tiefer liegt als die spezifische Rotation des entsprechenden  $\alpha$ -Anomeren<sup>2)</sup>. Zur Positionsbestimmung der Urethangruppe im Monophenylurethan XV reduzierten wir das Abbauprodukt mit  $\text{NaBH}_4$  in gepufferter Lösung<sup>23)</sup> zum D-Digitoxit-Derivat XVI<sup>23)</sup>. Falls die Strukturen XV und XVI zutreffen, muss das Reduktionsprodukt an (C-4)–(C-5) eine  $\alpha$ -Glykolgruppierung aufweisen. Tatsächlich konnte mit  $\text{NaJO}_4$  eine Aufspaltung von XVI in Acetaldehyd (als Dimedonderivat isoliert) und eine kristallisierte Tetrose  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$  (XVII) (= 3-Desoxy-L-glycero-tetrose-2-phenylurethan) erzielt werden. Diese Befunde sprechen eindeutig für die postulierte 3-Stellung des Urethanrests in XV.

Die beim Abbau von Digitoxin-tetraphenylurethan (VIII) auftretenden Zuckerderivate X und XV bilden einen sichern Beweis für die lineare Anordnung der Digitoxosen im Digitoxin (I) und für die Verknüpfung über 1,4-Bindungen; damit sind die mit Hilfe der Permethylierungsmethode gewonnenen analogen Resultate bestätigt.

Noch nicht exakt bewiesen sind dagegen die Konfigurationen der glykosidischen Bindungen. Immerhin sprechen die molekularen Drehungsbeiträge der einzelnen Digitoxosen im Digitoxin, Digitoxigenin-bis- und -mono-digitoxosid trotz grossen Abweichungen von den üblichen Fehlergrenzen eher für  $\beta$ -glykosidische Verknüpfungen<sup>10) 24)</sup> (Formel I).

Die vorliegenden Untersuchungen über Digitoxin liefern als zusätzliches Ergebnis einen einwandfreien Konstitutionsbeweis für die Zuckerkomponente der Lanatoside und Desacetyl-lanatoside<sup>25)</sup>. Auf Grund der jetzt gesicherten Zuckeranordnung im Digitoxin und der kürzlich ermittelten Konstitution der Acetyldigilanidobiose<sup>1) 10)</sup> muss der aus 3 Digitoxosen und 1 Glucose aufgebaute Tetrasaccharidrest<sup>26)</sup> der nativen Digitalisglykoside ebenfalls eine lineare, über 1,4-Bindungen verknüpfte Kette bilden<sup>27)</sup>.

<sup>22)</sup> pH ca. 7. Bei pH-Werten über 8,5 war eine Acylwanderung des Urethanrests zu befürchten.

<sup>23)</sup> Zur Ermittlung der günstigsten Reduktionsmethode führten wir zahlreiche Modellversuche mit D-Digitoxose durch. Der dabei isolierte D-Digitoxit war bereits von A. WINDAUS & G. SCHWARTE beschrieben worden: Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-Physik. Kl. 1926, 1; Chem. Zbl. 1927, I, 882. Unsere Präparate passten auf die Bruttoformel  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_4$  und stimmten auch im Smp. mit der Literaturangabe überein. Hingegen beobachteten wir einen Drehwert  $[\alpha]_D^{20} = -32,5^\circ$  (in Wasser), während WINDAUS & SCHWARTE  $[\alpha]_D^{20} = -86,3^\circ$  (in Wasser) fanden. Da ein mit Natriumamalgam hergestelltes Präparat (s. exp. Teil) ebenfalls  $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$  besass, dürfte die Angabe von WINDAUS & SCHWARTE auf einem Irrtum beruhen.

<sup>24)</sup> W. KLYNE, Biochem. J. 47, xli (1950).

<sup>25)</sup> Ausführliche Literaturzusammenstellung über Lanatoside und Desacetyl-lanatoside siehe bei A. STOLL & J. RENZ<sup>3)</sup> sowie bei A. STOLL, Chemistry & Ind. 1959, 1558.

<sup>26)</sup> Die Lanatoside besitzen an C-3 der dritten Digitoxose zusätzlich 1 Acetylgruppe.

<sup>27)</sup> Die  $\beta$ -glykosidische Verknüpfung der endständigen D-Glucose an C-4 der dritten Digitoxose-Einheit (1,4-Bindung) geht u. a. aus der Struktur der Acetyldigilanidobiose<sup>1) 10)</sup> (bei den Lanatosiden), bzw. der Digilanidobiose<sup>1)</sup> (bei den Desacetyl-lanatosiden) hervor.

Von den in der Therapie verwendeten Digitalisglykosiden sind nun einzig die Desgluco-ianatoside in ihrer Zuckerstruktur noch nicht völlig aufgeklärt. Diese Lücke soll in der nächsten Mitteilung durch die Konstitutionsermittlung der isomeren Acetyldigitoxine geschlossen werden<sup>2)</sup>.

### Experimenteller Teil<sup>2a)</sup>

*Permethylierung von Digitoxin.* 5,00 g reinstes Digitoxin wurde in 50 ml Dimethylformamid<sup>2b)</sup> gelöst, mit 20 ml Methyljodid<sup>2b)</sup> und 17,5 g Silberoxid versetzt und 24 Std. im Dunkeln gerührt. Nach Abfiltrieren der Silbersalze versetzte man das Filtrat mit Chloroform und schüttelte mehrmals mit 1-proz. wässriger KCN-Lösung, dann mit reinem Wasser aus. Die vereinigten Chloroformphasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand, 5,66 g, wurde in derselben Weise nochmals methyliert. Dabei entstanden 5,72 g amorphes, hellgelbes Methylierungsprodukt. Das Präparat war nicht einheitlich; im Dünnschichtchromatogramm ( $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Chloroform}$ ) traten 3–4 sehr nah beieinander liegende Flecke auf. – UV.-Spektrum: Flaches Maximum bei ca. 310  $\mu$ , keine selektive Absorption bei 217  $\mu$ .

Tetra-O-methyldigitoxin:

$\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$  (821,02) Ber. C 65,8 H 8,9 O 25,3  $\text{CH}_3\text{O}$  15,1%

Penta-O-methyldigitoxin:

$\text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{O}_{13}$  (835,05) Ber. C 66,2 H 8,9 O 24,9  $\text{CH}_3\text{O}$  18,6%  
Gef. „ 65,6 „ 9,0 „ 24,9 „ 16,9; 17,0%

*Nachmethylierung des methylierten Digitoxins:* 2,80 g Methylierungsprodukt aus Digitoxin wurden erneut mit  $\text{CH}_3\text{J}-\text{Ag}_2\text{O}$  in Dimethylformamid behandelt. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 2,79 g hellgelber Schaum gewonnen. Der Methoxygehalt war unverändert und betrug 17,0% (Durchschnitt aus 3 Analysen). Alle für den Butenolidring typischen Farbreaktionen<sup>14)</sup> fielen mit dem Permethylierungsprodukt negativ aus. Versuche zur chromatographischen Trennung des Permethylierungsgemisches führten lediglich zur Anreicherung einzelner Komponenten; die Isolierung eines einheitlichen Methylderivates gelang nicht.

*Hydrolyse von permethyliertem Digitoxin.* 2,53 g amorphes Methylierungsgemisch aus Digitoxin wurden in 150 ml Aceton gelöst, mit 50 ml 0,1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und 1,5 Std. unter Rückfluss erwärmt. Die nach dem Abkühlen leicht trübe Lösung engte man im Vakuum auf ca. 100 ml ein, wobei sich ein hellgelbes zähflüssiges Harz ausschied. Nach Dekantieren wurde es in Äther aufgenommen und mehrmals mit Wasser ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen wurden mit dem Aceton-Wasser-Konzentrat vereinigt und durch Einengen im Vakuum möglichst vollständig von Aceton befreit. Das sich dabei abscheidende Harz verteilte man wiederum zwischen Äther und Wasser. Alle wässrigen Auszüge und das vom Aceton befreite wässrige Konzentrat wurden vereinigt und mit  $\text{BaCO}_3$  neutralisiert. Nach Abnutschen der Bariumsalze dampfte man das Filtrat ein und erhielt 0,99 g farblosen Zuckersirup. Die Ätherlösungen der harzigen Ausfällungen wurden zur Abtrennung saurer Anteile mit 10-proz.  $\text{KHCO}_3$ -, 2N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - und 2N  $\text{NaOH}$ -Lösung extrahiert. Die vereinigten alkalischen Auszüge lieferten nach Ansäuern und Extraktion mit Chloroform 0,15 g dickflüssiges Öl; es wurde verworfen. Aus den Ätherphasen resultierten 1,47 g hellgelb gefärbtes Aglykongemisch. Da die Aglykonfraktion noch eine geringe Menge glykosidischer Stoffe enthielt, wurde sie in 75 ml Aceton gelöst und durch Kochen mit 25 ml 0,1N Schwefelsäure nachhydrolysiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie bereits beschrieben: neben 1,34 g Aglykongemisch wurden weitere 0,28 g Zuckersirup gewonnen. Insgesamt konnten als Hydrolyseprodukt 1,27 g Zuckergemisch isoliert werden.

<sup>2b)</sup> Alle Schmelzpunkte wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt. Zur Bestimmung der optischen Drehwerte wurden die Präparate 1 Std. bei 60–80° im Hochvakuum getrocknet. Die Dünnschichtchromatographien wurden nach E. STAHL, *Angew. Chem.* 73, 646 (1961), ausgeführt. Zur Entwicklung besprühten wir die Platten üblicherweise mit einer 20-proz.  $\text{SbCl}_5$ -Lösung in Chloroform und erwärmten kurze Zeit auf 100–120°. Die Analysen wurden in unserem Mikroanalytischen Labor (Dr. W. SCHÖNIGER) ausgeführt und die Spektren in unserer Spektralanalytischen Abteilung (Dr. H. G. LEE-MANN, Dr. M. KOHLER) aufgenommen. Den Herren K. BAUMGARTNER und P. SCHÖPFLIN danken wir für geschickte experimentelle Mitarbeit.

<sup>2a)</sup> Getrocknet mit Aluminiumoxid (WOELM).

Die *Aglykonfraktion* war frei von glykosidischen Begleitstoffen, und die Farbreaktionen nach KELLER-KILIANI<sup>30)</sup> und PÖHM & WEISER<sup>31)</sup> fielen dementsprechend negativ aus. Das Präparat gab auch mit RAYMOND-Reagens<sup>14)</sup> keine Färbung und zeigte im UV.- und IR.-Gebiet keine für den Lacton-Fünfring charakteristischen Absorptionsmaxima. Der Methoxylgehalt betrug 4,7%. Auf eine eingehendere Untersuchung wurde verzichtet.

*Zuckerfraktion*: Im Dünnschichtchromatogramm ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ /Chloroform-Äthanol-(19:1)) waren nach Entwicklung mit  $\text{SbCl}_5$  5 Flecke sichtbar: 3 rasch wandernde, schwach erkennbare Nebensubstanzen, eine erste, weniger schnell laufende Hauptkomponente (brauner Fleck) und ein zweites, noch langsamer wanderndes Hauptprodukt (blauvioletter Fleck). Die präparative Trennung der Hydrolyseprodukte (1,27 g) erfolgte durch Chromatographie an Aluminiumoxid (WOELM, Akt. 3). Mit Benzol-Methylenchlorid-Gemischen konnten die drei Nebenprodukte und 366 mg erste Hauptkomponente (3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose, III) ausgewaschen werden. Dann folgten 59 mg Mischfraktion und nach Zusatz von Methanol 708 mg zweite Hauptkomponente (D-Cymarose, IV).

*3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose (III)*. Die rohe Dimethyldigitoxose (366 mg) wurde im Hochvakuum bei 60° Badtemperatur destilliert. Dabei gingen 333 mg farbloser Sirup über,  $[\alpha]_D^{25} = +79,1^\circ$  ( $c = 0,960$  in Wasser). Das Präparat war chromatographisch einheitlich<sup>32)</sup> und wies die gleichen Rf-Werte auf wie das aus Cymarin hergestellte Vergleichspräparat (s. unten). IR.-Spektrum siehe Fig. 1.

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_4$	Ber. C 54,5	H 9,2	O 36,3	(2) $\text{CH}_3\text{O}$ 35,2%
(176,21)	Gef. „ 54,3	„ 9,1	„ 36,9	„ 33,6%

*p-Nitrobesylhydrazon von III*: 144 mg frisch destillierte 3,4-Di-O-methyl-digitoxose (III) (aus permethyliertem Digitoxin) und 176 mg *p*-Nitrobenzolsulfonylhydrazid wurden mit 1,6 ml Acetonitril gelöst und 2 Std. auf 70° erwärmt. Das nach dem Eindampfen im Vakuum gewonnene Rohprodukt wurde an Silicagel chromatographiert. Die Spitzenfraktionen lieferten aus Methanol-Äther-Pentan 150 mg Kristalle vom Smp. 127–129°.

$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{N}_2\text{S}$	Ber. C 44,8	H 5,6	O 29,8	N 11,2	S 8,6	(2) $\text{CH}_3\text{O}$ 16,5%
(375,40)	Gef. „ 44,5	„ 5,7	„ 29,3	„ 11,1	„ 8,8	„ 15,9%

*3,4-Di-O-methyl-D-digitoxonsäurelacton (VI)*. 150 mg Dimethyldigitoxose (aus permethyliertem Digitoxin) in 2,3 ml Wasser wurden mit 0,063 ml Brom versetzt und 3 Tage im Dunkeln stehengelassen. Dann wurde die Lösung durch Zutropfen von Tetralin entfärbt und mit Äther ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen neutralisierte man mit  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  und behandelte das Filtrat mit  $\text{H}_2\text{S}$ . Nach Entfernung des  $\text{Ag}_2\text{S}$ -Niederschlages wurde die farblose Lösung eingedampft. Der Rückstand (150 mg) ergab nach Destillation im Hochvakuum bei 60° Badtemp. 147 mg einheitliches 3,4-Di-O-methyl-digitoxonsäurelacton;  $[\alpha]_D^{25} = +34,1^\circ$  ( $c = 0,425$  in Chloroform)<sup>33)</sup>. IR.-Spektrum: Bande bei 1735  $\text{cm}^{-1}$  (flüssig).

*3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose (III) aus Cymarin (VII)*. 1,92 g Cymarin (im Hochvakuum bei 100° getrocknet) wurden mit 10 ml Methyljodid<sup>29)</sup> und 10 g trockenem Silberoxid in 10 ml Dimethylformamid<sup>29)</sup> methyliert. Die Aufarbeitung erfolgte wie beim Digitoxin beschrieben und lieferte 3,16 g orangefarbenes Harz. Nach dem Dünnschichtchromatogramm ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ /Chloroform) beurteilt, lag ein komplexes Gemisch von Permethylierungsprodukten vor. Der Lacton-Fünfring war bei der Methylierung angegriffen worden; seine charakteristischen Farbreaktionen<sup>14)</sup> fielen negativ aus. Zur Hydrolyse nahm man die Methyl derivative in 160 ml Aceton und 160 ml 0,1N Schwefelsäure auf und kochte die Lösung 1,5 Std. unter Rückfluss. Anschliessend wurde das Aceton zum grössten Teil im Vakuum abdestilliert, wobei sich ein gelber Niederschlag ausschied.

Die Lösung wurde abdekantiert und die Fällung in Chloroform aufgenommen. Das wässrige Konzentrat schüttelte man nun zuerst mit dieser Chloroformlösung und anschliessend mehrmals mit frischem Chloroform aus. Die Chloroformphasen wusch man mit wenig Wasser neutral, trocknete über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und dampfte ein. Es konnten 1,67 g Aglykonfraktion (gelber Schaum) gewonnen werden, die nicht weiter untersucht wurden. Das saure wässrige Konzentrat (inkl. Waschwasser) wurde mit  $\text{BaCO}_3$  neutralisiert. Nach üblicher Aufarbeitung liessen sich 485 mg

<sup>30)</sup> Ausführung nach J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 883 (1948).

<sup>31)</sup> M. PÖHM & R. WEISER, *Naturwiss.* 43, 582 (1956).

<sup>32)</sup> Die 3 Nebenprodukte verblieben im Destillationsrückstand (16 mg).

<sup>33)</sup> R. C. ELDERFIELD<sup>15)</sup> fand  $[\alpha]_D^{25} = +30^\circ$  (in Chloroform).

Zuckerfraktion als gelblicher Sirup isolieren. Zur Reinigung wurde an neutralem Aluminiumoxid (WOELM, Akt. 1) chromatographiert. Mit Benzol-Methylenchlorid und reinem Methylenchlorid konnten 240 mg rohe Dimethyldigitoxose abgelöst werden. Methylenchlorid-Methanol-Gemische eluierten noch 53 mg farbloses Material, das vorwiegend aus Cymarose bestand<sup>34</sup>). Die 240 mg Dimethyldigitoxose wurden im Hochvakuum destilliert und ergaben 205 mg chromatographisch einheitliches Destillat, das in den Rf-Werten und im IR.-Spektrum (Fig. 1) mit 3,4-Di-O-methyl-D-digitoxose (III) aus Digitoxin übereinstimmte.  $[\alpha]_D^{25} = +74,0^\circ$  ( $c = 0,64$  in Wasser),  $+83,1^\circ$  ( $c = 1,58$  in Chloroform) und  $+73,7^\circ$  ( $c = 1,98$  in Pyridin).

$C_8H_{16}O_4$	Ber. C 54,5	H 9,2	O 36,3	(2) $CH_3O$ 35 2%
(176,21)	Gef. „ 54,8	„ 9,2	„ 36,3	„ 33,6%

*p*-Nitrobesylhydrazon der Dimethyldigitoxose: 20,4 mg Dimethyldigitoxose (aus permethyliertem Cymarin) wurden durch Erwärmen mit 25,5 mg *p*-Nitrobenzolsulfonylhydrazid in 0,5 ml Acetonitril in das Nitrobesylhydrazon übergeführt. Das Rohprodukt wurde an Silicagel chromatographiert und lieferte 16,1 mg Kristalle vom Smp. 125–127°. Das Derivat zeigte mit dem oben beschriebenen Präparat keine Smp.-Depression, die IR.-Spektren waren gleich.

*D*-Cymarose (IV). 708 mg rohe Cymarose aus den Hydrolyseprodukten von permethyliertem Digitoxin wurden im Hochvakuum bei 60–90° destilliert. Es konnten 582 mg reine *D*-Cymarose (IV) gewonnen werden. Aus Äther-Pentan farblose Kristalle vom Smp. 76–79°;  $[\alpha]_D^{25} = +54,4^\circ$  ( $c = 1,055$  in Wasser)<sup>35</sup>). Im Dünnschicht-<sup>36</sup>) und im Papierchromatogramm<sup>37</sup>) zeigte das Präparat gleiche Rf-Werte wie authentische Cymarose, und auch die IR.-Spektren waren völlig übereinstimmend.

*D*-Cymaronsäurelacton (V): 156 mg Cymarose wurden in 2,6 ml Wasser gelöst und mit 0,071 ml Brom zum Lacton oxydiert. Nach üblicher Aufarbeitung konnten 67 mg farbloser Sirup isoliert werden;  $[\alpha]_D^{25} = -22,3^\circ$  ( $c = 0,965$  in Wasser)<sup>38</sup>). Das IR.-Spektrum zeigte die für ein  $\gamma$ -Lacton charakteristische Bande bei 1770  $cm^{-1}$  und stimmte mit der Absorption eines Testpräparates völlig überein.

*D*-Cymaronsäure-phenylhydrazid: 50 mg Lacton V wurden mit 0,030 ml Phenylhydrazin 30 Min. auf 100° erhitzt. Das Phenylhydrazid kristallisierte beim Abkühlen. Aus Methanol-Äther-Pentan wurden 26 mg farblose Nadeln vom Smp. 150–152° erhalten;  $[\alpha]_D^{25} = +6,2^\circ$  ( $c = 1,01$  in Methanol)<sup>38</sup>). Die Identifizierung als *D*-Cymaronsäure-phenylhydrazid erfolgte durch Misch-Smp. und Vergleich der IR.-Spektren<sup>1</sup>).

*Digitoxin-tetraphenylurethan* (VIII). 10 g im Hochvakuum bei 100° getrocknetes Digitoxin wurden in 60 ml abs. Pyridin gelöst und mit 10 ml Phenylisocyanat versetzt. Die klare Lösung wurde anschliessend 2 Std. unter Feuchtigkeitsausschluss auf 60° erwärmt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur gab man zur Zerstörung des überschüssigen Phenylisocyanats 5 ml Methanol zu und liess 15 Min. stehen. Dann wurden die Lösungsmittel im Vakuum verdampft und das rötlich gefärbte Rohprodukt (22,10 g) an 600 g neutralem Aluminiumoxid (WOELM, Akt. 3) chromatographiert. Mit Benzol-Chloroform-(1:1) wurden zuerst rund 5 g Phenylcarbaminsäuremethylester und geringe Mengen Diphenylharnstoff eluiert. Mit reinem Chloroform und mit Chloroform-Äthanol-(95:5 und 9:1) konnten 15,86 g reines Digitoxin-tetraphenylurethan (VIII) ausgewaschen werden. Nach Umlösen aus Methanol erhielt man farblose Kristalle vom Smp. 186–189°;  $[\alpha]_D^{25} = +103,3^\circ$  ( $c = 0,498$  in Chloroform) und  $+17,6^\circ$  ( $c = 0,484$  in Pyridin). Das Präparat erwies sich im Dünnschichtchromatogramm einheitlich. IR.-Spektrum in Nujol: 3500, 3300–3450 (–OH, –NH–), 1780, 1735, 1640 (Butenolidring), 1717, 1550 (–CO–NH–), 1600, 1508,

<sup>34</sup>) Die Zuckerkomponente des Cymarins war nach einmaliger Umsetzung mit  $CH_3J$  nicht vollständig methyliert worden.

<sup>35</sup>) Der Smp. von *D*-Cymarose liegt üblicherweise bei ca. 80°. Völlig trockene Präparate schmelzen bei 100–102°;  $[\alpha]_D^{25} = +52^\circ$  ( $c = 1,00$  in Wasser). Vgl. W. A. JACOBS, J. biol. Chemistry 88, 519 (1930); W. A. JACOBS & R. C. ELDERFIELD, *ibid.* 97, 625 (1931).

<sup>36</sup>)  $Al_2O_3$ /Chloroform-Äthanol-(97:3), Entwicklung mit  $SbCl_5$ .

<sup>37</sup>) Systeme: Butanol-Pyridin-Wasser-(6:4:3) und Toluol-Butanol-Wasser-(8:2:1). Vgl. A. JEANES, C. S. WISE & R. J. DIMLER, Analyt. Chemistry 23, 415 (1951), sowie O. RENKONEN & O. SCHINDLER, Helv. 39, 1490 (1956).

<sup>38</sup>) Nach R. C. ELDERFIELD<sup>15</sup>) zeigten *D*-Cymaronsäurelacton  $[\alpha]_D^{25} = -25^\circ$  ( $c = 2,5$  in Wasser), *D*-Cymaronsäure-phenylhydrazid Smp. 154° und  $[\alpha]_D^{25} = +2^\circ$  ( $c = 0,9$  in Methanol).

1450  $\text{cm}^{-1}$  (aromat. Ring). Zur Analyse wurde das Präparat 3 Std. bei 120° im Hochvakuum getrocknet und im Schweinchen eingewogen.

$\text{C}_{69}\text{H}_{84}\text{O}_{17}\text{N}_4$	Ber. C 66,8	H 6,8	O 21,9	N 4,5%
(1241,4)	Gef. „ 66,5	„ 7,1	„ 21,9	„ 4,6%

*Methanolyse des Digitoxin-tetraphenylurethans (VIII)*. Eine Lösung von 5,00 g Phenylurethan VIII in 100 ml 1-proz. abs. methanolischer Salzsäure wurde bei 20° während 62 Std. stehen gelassen. Dann neutralisierte man mit  $\text{BaCO}_3$ , klärte die Lösung durch Talk und dampfte das Filtrat im Vakuum ein. Der Rückstand wurde dreimal mit je 50 ml trockenem Chloroform ausgekocht und die vereinigten, klar filtrierten Chloroformextrakte eingedampft. Es wurden 5,20 g gelber Sirup erhalten. Im Dünnschichtchromatogramm ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ /Chloroform mit 1,6% Äthanol) waren Digitoxigenin und 6 verschiedene Zuckerderivate (IX–XIV) festzustellen; die Bis-phenylurethane zeigten beim Besprühen mit  $\text{SbCl}_3$  gelbe Flecke, die Mono-phenylurethane (XI–XIII) ergaben bläuliche Flecke, und Digitoxigenin erschien als grüner Fleck. Zur Isolierung des Aglykonanteils wurde das Gemisch der Methanolyseprodukte mit 70 ml abs. Äther ausgekocht, wobei 1,25 g kristallisiertes Digitoxigenin ungelöst blieben. Der ätherlösliche Anteil (3,94 g) wurde in Benzol-Pentan-(3:1) aufgenommen und an 120 g neutralem Aluminiumoxid (WOELM, Akt. 3) chromatographiert. Mit Benzol-Pentan-(2:1 und 1:1) konnten 644 mg kristallisiertes Anomeren-gemisch der Bis-phenylurethane (IX und X) vom Smp. 100–102° abgelöst werden. Die mit reinem Benzol eluierten Fraktionen waren nicht einheitlich, lieferten aber bei der Nachchromatographie weitere 910 mg kristallisierte Bis-phenylurethane (IX und X) vom Smp. 80–95°. Beim Auswaschen der Säule mit Chloroform-Methanol wurden 2,296 g Mono-phenylurethanderivate (XI–XIV) erhalten. Dieses Gemisch wurde nicht weiter getrennt, sondern wie unten beschrieben zu XV hydrolysiert.

*$\beta$ -Methyl-D-digitosid-3,4-bis-phenylurethan (X)*. Die Rohkristallisate aus der obigen Chromatographie wurden mehrmals aus Benzol, Methanol und Methanol-Wasser umkristallisiert. Das Spitzenpräparat bildete feine Nadelchen vom Smp. 107–111°;  $[\alpha]_D^{20} = +107,8^\circ$  ( $c = 0,570$  in 95-proz. Pyridin), und stellte das einheitliche  $\beta$ -Anomere X dar. Die  $\alpha$ -Form (IX) war in den Mutterlaugen angereichert und wurde hier nicht isoliert<sup>2)</sup>. IR.-Spektrum siehe Fig. 2.

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{N}_2$	Ber. C 63,0	H 6,0	O 24,0	N 7,0%
(400,44)	Gef. „ 62,9	„ 6,0	„ 24,1	„ 6,9%

*D-Digitoxose-3-phenylurethan (XV)*. 2,296 g Chloroform-Methanol-Eluat aus der oben beschriebenen Chromatographie wurden in 16 ml Aceton und 16 ml 0,1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  aufgenommen und die Lösung 1,5 Std. unter Rückfluss erwärmt. Nach dem Abkühlen neutralisierte man mit  $\text{BaCO}_3$ , klärte durch Talk und dampfte das farblose Filtrat im Vakuum ein. Der Rückstand (2,00 g) wurde viermal mit je 20 ml Wasser bei 70° digeriert, wobei ein unlöslicher Anteil von 0,683 g erhalten wurde, der nach der Dünnschichtchromatographie beurteilt aus Ausgangsmaterial bestand. Die wasserlösliche Fraktion stellte praktisch einheitliches D-Digitoxose-3-phenylurethan (XV) dar. Umkristallisation aus Chloroform-Benzol und aus Essigester lieferte farblose Nadelchen vom Smp. 125–128°;  $[\alpha]_D^{20} = +52,4^\circ$  (nach 15 Min.) und  $+64,4^\circ$  (Endwert nach 15 Std.,  $c = 0,544$  in 95-proz. Pyridin). IR.-Spektrum siehe Fig. 3.

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}$	Ber. C 58,4	H 6,4	O 29,9	N 5,3%
(267,29)	Gef. „ 58,5	„ 6,3	„ 29,6	„ 5,2%

*D-Digitoxit-3-phenylurethan (XVI)*. 270 mg D-Digitoxose-3-phenylurethan (XV) wurden in 15 ml Dimethylformamid unter kräftigem Vibrieren gelöst und mit 15 ml Citratpuffer (pH 7) versetzt. Bei 0° wurden innert 15 Min. 200 mg fein pulverisiertes  $\text{NaBH}_4$  eingetragen. Nach 1stdg. Reaktion bei 0° beobachtete man ein pH von 7,5–8,0. Man erwärmte nun auf 25° und blies solange  $\text{CO}_2$  durch die Suspension, bis pH 6,5 erreicht war. Dann wurde kurz auf 50° erwärmt, mit wenigen Tropfen Salzsäure versetzt (pH 5,0) und im Vakuum eingedampft. Den weissen, schmierigen Rückstand nahm man in 100 ml Methanol auf, stellte den pH-Wert der Lösung mit Salzsäure auf 4 und kochte 2 Std. unter Rückfluss. Die jetzt trübe Lösung wurde klar filtriert und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand digerierte man zweimal mit je 100 ml Aceton. Aus den Acetonextrakten resultierten 390 mg hellgelb gefärbter Sirup. Im Dünnschichtchromatogramm<sup>39)</sup> dieses Präparates waren ein Hauptfleck, der etwas langsamer lief als das Ausgangsmaterial, und ein Nebenfleck mit sehr kurzer Laufstrecke nachweisbar. Der Sirup wurde in Äthanol gelöst und mit wenig Kohle aufgeköcht. Nach dem Eindampfen resultierten 213 mg D-Digitoxit-3-phenyl-

urethan (XVI). Aus Aceton-Äther oder Essigester-Äther Kristalle vom Smp. 111–113°;  $[\alpha]_D^{21} = -37,6^\circ$  ( $c = 1,40$  in Methanol),  $[\alpha]_D^{22} = -32,1^\circ$  ( $c = 0,81$  in Äthanol) und  $[\alpha]_D^{21} = -53,0^\circ$  ( $c = 0,92$  in 95-proz. Pyridin).

$C_{13}H_{19}O_5N$	Ber. C 58,0	H 7,1	O 29,7	N 5,2%
(269,30)	Gef. ,, 57,9	,, 7,0	,, 29,4	,, 5,3%

*Oxydative Spaltung von D-Digitoxit-3-phenylurethan (XVI)*. Eine Lösung von 140 mg Digitoxit-3-phenylurethan (XVI) in 13 ml Wasser wurde mit 123 mg  $NaJO_4$ , gelöst in 13 ml Wasser, versetzt. Durch die Lösung leitete man  $CO_2$  in langsamem Strom. Das austretende Gas passierte eine Waschflasche, die 146 mg frisch sublimiertes Dimedon in 35 ml Wasser gelöst enthält. Nach ca. 16 Std. hatten sich reichlich Kristalle vom Smp. 140–141° abgeschieden. Ihre Identifizierung als *Acetaldehyd-Dimedon-Derivat* erfolgte durch Mischprobe, Vergleich der IR.-Spektren und Analyse.

$C_{18}H_{26}O_4$ (306,41)	Ber. C 70,6	H 8,5	O 20,9%	Gef. C 70,8	H 8,5	O 21,2%
----------------------------	-------------	-------	---------	-------------	-------	---------

*3-Desoxy-L-glycero-tetrose-2-phenylurethan (XVII)*: Die Oxydationslösung aus der oben beschriebenen Spaltung wurde mit Chloroform-Alkohol-(2:1) extrahiert. Aus den organischen Phasen liessen sich 103 mg hellgelber Sirup erhalten, der aus Aceton-Äther spontan kristallisierte. Es wurden 55 mg farblose Kristalle vom Smp. 96–98° gewonnen;  $[\alpha]_D^{21} = -28,4^\circ$  ( $c = 0,54$  in Methanol) und  $+2,9^\circ$  ( $c = 0,53$  in 95-proz. Pyridin). Das Desoxytetrose-phenylurethan XVII reduzierte FEHLING'sche Lösung. Als Nachweisreaktionen bei der Dünnschichtchromatographie eigneten sich Vanillin-Perchlorsäure<sup>41)</sup>, Anilinphtalat-Phosphorsäure<sup>42)</sup> oder Chromsäure<sup>39)</sup>; mit  $SbCl_3$  oder Perjodat-Benzidin<sup>40)</sup> trat keine Reaktion auf.

$C_{11}H_{13}O_4N$	Ber. C 59,2	H 5,9	O 28,6	N 6,3%
(223,23)	Gef. ,, 59,0	,, 5,8	,, 28,7	,, 6,3%

*D-Digitoxit*. – a) *Reduktion von D-Digitoxose mit  $NaBH_4$* : In eine Lösung von 1,50 g Digitoxose in 150 ml Citratpuffer (pH 7,0) wurden bei 0° unter intensivem Rühren oder Vibrieren 2 g  $NaBH_4$  in Portionen eingetragen. Man hielt 1 Std. bei 0° und dann eine weitere Stunde bei 20°. Der auf ca. 8,5 gestiegene pH-Wert liess sich durch Einblasen von  $CO_2$  auf 6,5 einstellen. Die Lösung wurde dann auf 50° erwärmt und nach Ansäuern mit konz. Salzsäure (pH 4,5) im Vakuum eingedampft. Den Rückstand kochte man mit 500 ml Methanol, um ungelöste Salze abzutrennen. Das Filtrat wurde mit Salzsäure versetzt (pH 1,5) und 16 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abdampfen des Lösungsmittels konnten 2,10 g hellgelber Sirup gewonnen werden. Aus Aceton-Äther schieden sich 960 mg farblose Kristalle vom Smp. 87–89,5° ab;  $[\alpha]_D^{20} = -32,5^\circ$  ( $c = 0,99$  in Wasser)<sup>39)</sup>,  $[\alpha]_D^{22} = -25,6^\circ$  ( $c = 0,72$  in Methanol),  $[\alpha]_D^{20} = -27,1^\circ$  ( $c = 1,00$  in Äthanol),  $[\alpha]_D^{20} = -23,3^\circ$  ( $c = 1,40$  in Pyridin) und  $[\alpha]_D^{22} = -29,7^\circ$  ( $c = 0,96$  in 95-proz. Pyridin). Das Präparat war im Dünnschichtchromatogramm<sup>43)</sup> einheitlich und lief langsamer als D-Digitoxose.

$C_6H_{14}O_4$ (150,18)	Ber. C 48,0	H 9,4	O 42,6%	Gef. C 47,8	H 9,3	O 42,2%
-------------------------	-------------	-------	---------	-------------	-------	---------

b) *Reduktion von D-Digitoxose mit Natriumamalgam*<sup>39)</sup>: 500 mg Digitoxose wurden in 50 ml Wasser gelöst. Unter Einleitung von  $CO_2$  und kräftigem Rühren gab man 15 g frisch hergestelltes Natriumamalgam (2,1-proz.) in Portionen zu. Der pH-Wert der Lösung lag zwischen 8 und 9. Die FEHLING'sche Reaktion war erst nach weiteren Zugaben von frischem Na-amalgam (total 105 g) und nach einer Reaktionszeit von 24 Std. negativ. Man trennte das abgeschiedene Quecksilber im Scheidetrichter ab, filtrierte die wässrige Lösung durch Talk und dampfte im Vakuum ein. Der Rückstand wurde mit Alkohol ausgekocht und die geklärten Alkoholextrakte zur Trockne gebracht. Es wurden 424 mg Digitoxit gewonnen, der aus Aceton-Äther 326 mg Kristalle vom

<sup>39)</sup> Silicagel/Chloroform-Alkohol-(4:1); Entwicklung: Perjodat-Benzidinacetat<sup>40)</sup> (weisse Flecke auf blauem Grund), Chromsäure (2,67 g  $CrO_3$  und 2,3 ml konz.  $H_2SO_4$  mit Wasser *ad* 100 ml; nach 15 Min. bei 100° graugrüne Flecke auf gelbem Grund) oder Vanillin-Perchlorsäure<sup>41)</sup> (blauviolette Flecke).

<sup>40)</sup> M. VISCONTINI, D. HOCH & P. KARRER, *Helv.* **33**, 642 (1955).

<sup>41)</sup> P. GODIN, *Nature* **174**, 134 (1954); A. P. MACLENNAN, H. M. RANDALL & W. D. SMITH, *Analyt. Chemistry* **31**, 2020 (1959).

<sup>42)</sup> M. WYSS-HUBER, H. JÄGER & E. WEISS, *Helv.* **43**, 1010 (1960).

<sup>43)</sup> Silicagel/Chloroform-Äthanol-(7:3) oder -(4:1); Entwicklung mit Perjodat-Benzidinacetat<sup>40)</sup> oder Chromsäure<sup>39)</sup>.

Smp. 84–88° lieferte. Nach mehrmaliger Umkristallisation wurde ein einheitliches Präparat vom Smp. 87–88° erhalten;  $[\alpha]_D^{22} = -33,8^\circ$  ( $c = 1,82$  in Wasser). Die Identität mit dem durch  $\text{NaBH}_4$  gewonnenen Reduktionsprodukt wurde durch Mischprobe, Vergleich der Rf-Werte und IR-Spektren bewiesen.

$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_4$  (150,18) Ber. C 48,0 H 9,4 O 42,6% Gef. C 47,7 H 9,1 O 42,2%

*Di-O,O-benzyliden-D-digitoxit*. 234 mg D-Digitoxit wurden nach der Vorschrift von WINDAUS & SCHWARTZ<sup>23)</sup> mit 0,5 ml Benzaldehyd und 1,5 ml 50-proz. Schwefelsäure umgesetzt. Es resultierten 528 mg hellgelber Sirup, die aus Methylenchlorid-Äther-Pentan 283 mg Kristalle vom Smp. 110–111° ergaben, nach Umkristallisieren aus Methanol 182 mg Kristalle vom Smp. 139–141°<sup>44)</sup>.  $[\alpha]_D^{22} = +67,3^\circ$  ( $c = 0,79$  in Chloroform),  $+64,7^\circ$  ( $c = 0,94$  in 95-proz. Pyridin).

$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$  (326,40) Ber. C 73,6 H 6,8 O 19,6% Gef. C 73,7 H 6,7 O 19,4%

#### SUMMARY

In order to elucidate the structure of its sugar moiety, digitoxin (I) has been permethylated. Since it was not possible to isolate a homogeneous O-methyl derivative of (I) the mixture of permethylation products was degraded by hydrolysis. As parts of the sugar moiety, 3,4-di-O-methyl-D-digitoxose (III) and D-cymarose (IV) could be isolated in a 1:2 ratio.

The reaction of digitoxin (I) with phenylisocyanate gave homogeneous and crystalline digitoxin-tetraphenylurethane (VIII) which was cleaved by methanolysis into digitoxigenin and the methylglycosides of both D-digitoxose-3-phenylurethane (XV) and D-digitoxose-3,4-bis-phenylurethane (IX, X). Characterization and quantitative determination of the glycosidic fragments proved the linear arrangement of the three digitoxose units in digitoxin (I) as well as their 1,4-linkages.

From the constitution of digitoxin (I), the structures of the sugar moiety of both lanatosides and deacetyl-lanatosides follow. In all these *Digitalis* glycosides, the tetrasaccharide part must form a straight, 1,4-linked chain.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien  
SANDOZ A.G., Basel

<sup>44)</sup> In der Literatur<sup>23)</sup> ist der Smp. mit 142° (aus Methanol) angegeben.

## 103. Die Konstitution der isomeren Acetyldigitoxine

48. Mitteilung über Herzglykoside<sup>1)</sup>

von Max Kuhn, Heinz Lichti und Albert von Wartburg

(6. III. 62)

Die genuinen Hauptglykoside der *Digitalis lanata* EHRH., die Lanatoside A, B und C<sup>2)</sup>, spalten bei der Einwirkung spezifischer Enzyme wie Digilanidase, Digipulpidase u. a.<sup>3)</sup> leicht 1 Mol. D-Glucose ab und gehen in die entsprechenden Desglucose-Derivate Acetyldigitoxin, Acetylgitoxin und Acetyldigoxin über<sup>4)</sup>. Diese glucose-

<sup>1)</sup> 47. Mitt.: H. LICHTI, M. KUHN & A. VON WARTBURG, *Helv.* 45, 868 (1962).

<sup>2)</sup> A. STOLL & W. KREIS, *Helv.* 16, 1049 (1933).

<sup>3)</sup> a) A. STOLL, A. HOFMANN & W. KREIS, *Z. physiol. Chem.* 235, 249 (1935); b) A. STOLL & J. RENZ, *Enzymologia* 7, 362 (1939); c) A. STOLL, J. RENZ & A. BRACK, *Helv.* 34, 397 (1951).

<sup>4)</sup> A. STOLL & W. KREIS, *Helv.* 17, 592 (1934); 35, 1318 (1952); A. STOLL, A. VON WARTBURG & W. KREIS, *Helv.* 35, 1324 (1952).