

170. Biosynthese der Digitoxose in *Digitalis lanata* EHRH. (Vorversuch)Desoxyzucker, 39. Mitteilung¹⁾von **J. v. Euw** und **T. Reichstein**

(1. V. 66)

Wenn man von der 2-Desoxy-D-ribose der Desoxyribonucleinsäuren absieht, wurden 2-Desoxyzucker in höheren Pflanzen bisher fast ausschliesslich in Cardenolid- und Pregnan-Glykosiden nachgewiesen [2]. Diese Glykoside zeigen in ihrem Bau noch andere charakteristische Besonderheiten [3]. Bei den 2-Desoxyzuckern dieser Glykoside handelt es sich durchwegs um 2-Desoxyhexosen und 2,6-Didesoxyhexosen, die teilweise in 3-O-Stellung noch methyliert sind und von denen in der Natur eine erstaunliche Vielfalt von Raumisomeren vorkommen [2]. Am längsten bekannt ist die Digitoxose (7), die erstmals von KILIANI [4] aus Digitoxin (6) isoliert wurde. Die Struktur 7 wurde von MICHEEL [5] sichergestellt, und die Synthese ist beschrieben [6]. Über die Biosynthese der Digitoxose konnten wir keine Angaben finden; wir beschreiben hier einen Vorversuch.

11 mg D-Glucose-[6-¹⁴C] (1) (total 0,3 mC = $333 \cdot 10^6$ dpm)²⁾ wurden mit Hilfe der Dochtmethode wie früher beschrieben [7a] an 20 junge «A-Pflanzen» [7a] von *Digitalis lanata* EHRH. verabreicht. Nach 14 Tagen wurden die Blattrosetten abgeschnitten (Gewicht total 660 g) und bei ca. 40° getrocknet (Trockengewicht 168 g). Nach Weichen mit Wasser (Fermentierung) und Aufarbeitung wie früher [7a] wurden die in Tab. 1 genannten Mengen an Rohextrakten gewonnen.

Tabelle 1. Ausbeuten an Rohextrakten aus 168 g getrockneten Blättern von *Digitalis lanata*, geerntet 14 Tage nach Verabreichung von total $333 \cdot 10^6$ dpm D-Glucose-[6-¹⁴C]

Art des Extraktes	Menge in g	Radioaktivität in dpm	
		pro mg	total
Petroläther- (Fette, Sterole usw.)	3,0	1160	$3,48 \cdot 10^6$
Chloroform- (vorwiegend Cardenolide)	10,5	nicht bestimmt	
Chf-Alk-(3:2)-(vorwiegend Saponine usw.)	4,1	2120	$8,70 \cdot 10^6$

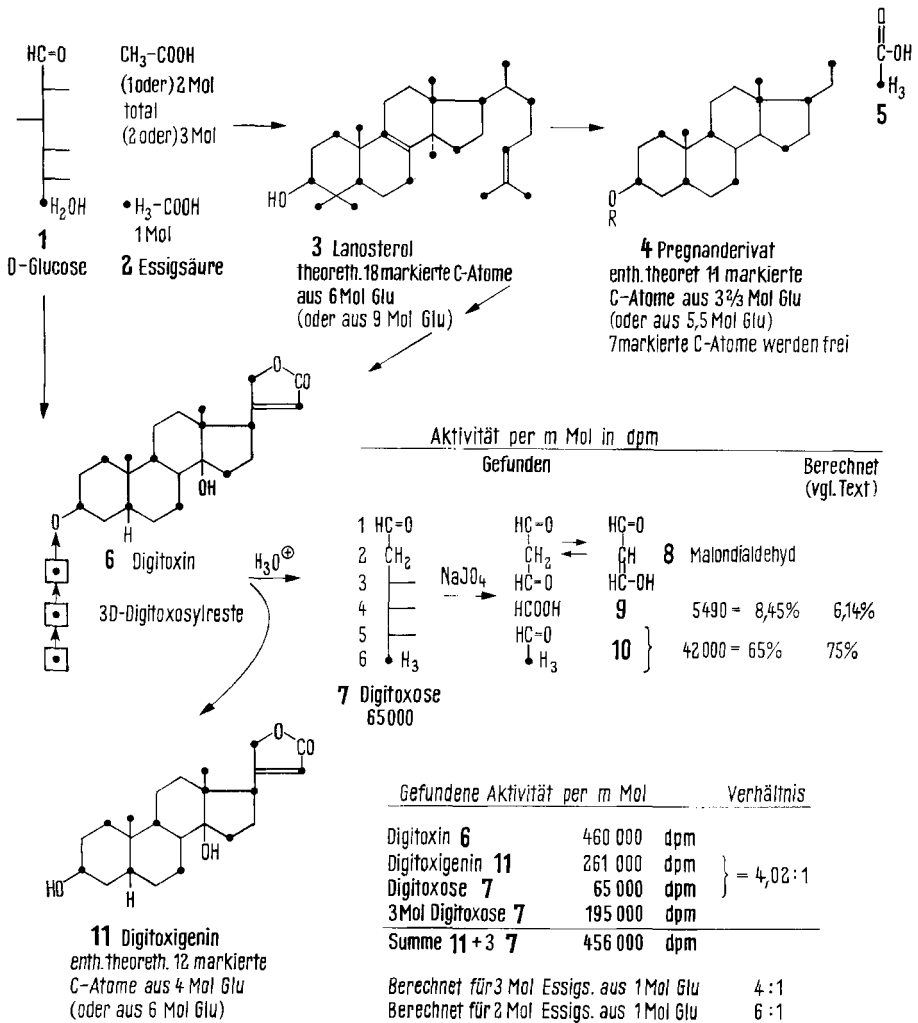
Bisher wurde nur der Chloroformextrakt untersucht. Chromatographie an Al₂O₃ gab 9 mg krist. Digitoxigenin, Smp. 258–262°, 4 mg nicht identifizierte Kristalle, Smp. 220–223°, und 318 mg krist. Digitoxin (6), davon 242 mg analysenreines Material (Präp. 1250), Smp. 266–270°. In den Mutterlaugen und amorphen Anteilen liessen sich durch Papier- und Dünnschichtchromatographie neben nicht identifizierten Stoffen wenig Gitoxigenin und Gitoxin nachweisen, die aber nicht rein isoliert wurden.

Das krist. Digitoxin (6) erwies sich als radioaktiv (vgl. Tab. 2). Es wurde einer milden sauren Hydrolyse unterworfen, worauf beide Spaltstücke, Digitoxigenin (11)

¹⁾ 38. Mitt. vgl. [1].

²⁾ Bezogen von der NEW ENGLAND NUCLEAR CORP., Boston, Mass., USA.

und Digitoxose (7), in reinen Kristallen isoliert wurden. Beide waren stark radioaktiv, das Genin aber wesentlich stärker als der Zucker (vgl. Diskussion). Abgebaut wurde bisher nur die Digitoxose. Falls dieser Zucker in der Pflanze aus D-Glucose ohne Veränderung der C-Kette entsteht und keine anderen Reaktionen stattfinden, welche eine Verteilung der Radioaktivität verursachen, so sollte dieser Zucker seine ganze Aktivität noch in C-6 enthalten. Bisher konnte nur ein Abbau mit NaJO_4 durchgeführt werden, wobei sich zeigte, dass die Hauptmenge der Aktivität vermutlich wirklich in C-6 konzentriert ist, dass ein erheblicher Teil aber noch in den anderen C-Atomen enthalten sein muss (vgl. Diskussion). Es ist bekannt, dass Digitoxose beim Abbau mit NaJO_4 in 0,1N H_2SO_4 rasch je eine Molekel Acetaldehyd (10), Ameisensäure (9) und Malondialdehyd (8) liefert [8]; letzterer wird relativ langsam weiter zu CO_2 und zwei Mol. Ameisensäure oxydiert [9], wie dies für substit. Malonaldehyde schon früher



beschrieben wurde [10]³⁾. Wir haben für den Abbau eine Probe (56 mg) der radioaktiven Digitoxose (7) mit NaJO₄-HJO₄-Gemisch in Wasser bei 45° behandelt⁴⁾. Die Reaktion war dann nach 2 Std. beendet. Wir erhielten 44,5 mg (= 65,8%) an Rohkristallen (Smp. 125–126,5°) von Acetaldehyd-*p*-nitrophenylhydrazon und daraus 28 mg analysenreines Material (Präp. 1253). Aus der wässrigen Lösung wurde Ameisensäure in Form ihres schwer löslichen Pb-Salzes (10,9 mg krist. Präp. 1254) isoliert. Über die gefundenen Aktivitäten orientiert Tab. 2. Alle zur Messung benützten Präparate wurden wie früher [7] direkt, also ohne Verdünnung mit Trägermaterial, isoliert, so dass auch relativ geringe Aktivitäten ziemlich genau bestimmt werden konnten.

Tabelle 2. Radioaktivität des Digitoxins und der daraus bereiteten krist. Abbauprodukte, nach Verabreichung von D-Glucose-[6-¹⁴C]

Präparat Nr.	Stoff Bruttoformel	Smp. (aus)	Gefundene Radioaktivität in dpm	
			pro mg	pro mMol
1250	Digitoxin (6) C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃ (764,9)	266–270° (Me-Ae)	603 ⁵⁾	460 000
1251	Digitoxigenin (11) C ₂₃ H ₃₄ O ₄ (374,5)	250–257° (An-Ae)	698 ⁶⁾	261 000
1252	Digitoxose (7) C ₆ H ₁₂ O ₄ (148,16)	115–117° (An-Ae)	440 ⁷⁾	65 000
1253	Acetaldehyd- <i>p</i> -nitrophenylhydrazon C ₈ H ₉ O ₂ N ₃ (179,18)	128–129° (Be-Ae)	234 ⁷⁾	42 000
1254	Bleiformiat Pb(HCO ₂) ₂ (297,25)	265–270° (Zers.) (Wasser)	37 ⁵⁾	5490 ⁸⁾

Diskussion der Resultate. Der Versuch zeigt, dass D-Glucose von der Pflanze zum Aufbau des Digitoxins (6) verwendet wird. Die Einbaurate ist allerdings merklich kleiner als bei Verabreichung von Mevalonsäure-[3-¹⁴C] unter genau gleichen Bedingungen [7], was leicht verständlich ist⁹⁾. Auch die Tatsache, dass nicht nur der Zucker, sondern auch der Geminanteil, letzterer sogar in besonders hohem Ausmass, Radioaktivität enthielt, ist leicht verständlich (siehe unten). Bei der Digitoxose (7)

³⁾ Nach Privatmitteilung von L. und P. SZABÓ (Brief v. 9. 3. 1966) werden aus Digitoxose (6×10^{-4} M) mit $6,6 \times 10^{-3}$ M NaJO₄ in 0,1N wässriger H₂SO₄ bei + 4° nach 2 Std. 2 Mol. NaJO₄ unter Bildung von Malondialdehyd verbraucht, worauf die Reaktion praktisch zum Stillstand kommt. Der Malondialdehyd war unter dieser Bedingung mindestens 150 Std. lang beständig.

⁴⁾ Bei Vorversuchen mit nicht radioaktiver Digitoxose wurden unter diesen Bedingungen die besten Ausbeuten an Acetaldehyd-*p*-nitrophenylhydrazon erhalten.

⁵⁾ Mittel aus zwei, innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmenden Bestimmungen.

⁶⁾ Mittel aus drei, innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmenden Bestimmungen.

⁷⁾ Mittel aus vier, innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmenden Bestimmungen.

⁸⁾ Berechnet auf einen Formiatrest, also auf $\frac{1}{2}$ mMol Pb(HCO₂)₂.

⁹⁾ Der Gehalt an D-Glucose in der Pflanze dürfte immer erheblich höher sein und rascher nachgeliefert werden als derjenige an Mevalonsäure, so dass bereits während der Injektion und kurze Zeit darauf bei D-Glucose eine erheblich stärkere Verdünnung eintritt. Vor allem wird D-Glucose in der Pflanze aber nicht nur zur Synthese von Mevalonsäure und ihren Folgeprodukten verwendet, sondern auch zur Bildung zahlreicher anderer Produkte, was zu einer stärkeren Verteilung der Aktivität führen muss.

wurde die Hauptmenge der Aktivität (ca. 65%) im Acetaldehyd (**10**) gefunden, der nach bisherigen Erfahrungen [8] [9] [10] ausschliesslich aus den C-Atomen 5–6 stammt. Dies spricht sehr stark dafür, dass die Bildung der Digitoxose in der Pflanze im wesentlichen oder ausschliesslich aus D-Glucose ohne Änderung des C-Gerüsts entsteht. Die Verteilung der restlichen 35% der Aktivität ist noch nicht genau abgeklärt. Die beim Abbau erhaltene Ameisensäure dürfte in erster Linie von C-4 stammen. Ein Teil könnte aber auch durch Überoxydation des Malondialdehyds (**8**) [9] aus den C-Atomen 1 und 3 entstanden sein (Erklärungsversuch für die Ursache der Aktivität an C-4 usw. vgl. weiter unten).

Die Summe der für beide Spaltstücke gefundenen Aktivitäten (Genin **11** + 3 Digitoxosen (**7**), vgl. Formelseite) stimmt gut mit der für das Digitoxin (**6**) ermittelten überein. Die relativ hohe Aktivität des Digitoxigenins (**11**) ist nicht überraschend, da ja die zur Synthese dieses Anteils notwendige Essigsäure (**2**) in der Pflanze aus D-Glucose entsteht [11] [12]. Diese Reaktion kann biologisch auf verschiedenen Wegen erfolgen [11–14]. Für höhere Pflanzen ist der oxydative Abbau der Glucose nach Glykolyse (EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS-Abbau) sowie über den Pentosephosphat-Cyclus (DICKENS, DISCHE, HORECKER, RACKER u. a. [14]) weitgehend gesichert [12], wobei für die Bildung der Essigsäure der erstgenannte Prozess die Hauptrolle zu spielen scheint. Die C-Atome 1 und 6 der Glucose liefern dabei die Methylgruppen der Essigsäure, während die C-Atome 3 und 4 in CO₂ übergeführt werden. Im tierischen Organismus wird dieses CO₂ ausgeschieden, so dass ein Mol. D-Glucose zwei Mol. Essigsäure liefert. Bei höheren Pflanzen ist damit zu rechnen, dass dieses CO₂ wieder assimiliert, also in D-Glucose zurückgeführt wird. In diesem Falle würden im Endeffekt aus 1 Mol. D-Glucose drei Mol. Essigsäure entstehen. Dasselbe ist zu erwarten, wenn für den Abbau der D-Glucose zu Essigsäure andere Wege beschritten werden, die ohne C-Verlust verlaufen. Das von uns gefundene Verhältnis der Aktivitäten Genin:Zucker = 4,02:1 lässt sich am einfachsten verstehen, wenn man annimmt, dass in *Digitalis lanata* aus 1 Mol. D-Glucose tatsächlich drei Mol. Essigsäure entstehen. Dies zeigt folgende Überlegung.

Digitoxigenin entsteht aus Essigsäure vermutlich via Lanosterol (**3**) (oder ein analoges Sterol) und ein Pregnanderivat **4** [7a] [15]. Aus D-Glucose-[6-¹⁴C] (**1**) sollte daher ein Digitoxigenin (**11**) entstehen, das 12 markierte C-Atome enthält, die aus 4 Mol. D-Glucose stammen. Wenn keine anderen Reaktionen stattfinden und Digitoxose ohne Veränderung der C-Kette aus D-Glucose entsteht, so sollte im Endeffekt das Genin genau 4mal stärker aktiv sein als die Digitoxose, was erstaunlich genau mit dem gefundenen Wert übereinstimmt. Dies Verhältnis würde sich etwas zu Gunsten des Zuckers verschieben, wenn man annimmt, dass die für den Zuckeranteil beobachtete «Verschmierung» der Aktivität (Erklärungsversuch siehe unten) gleichmässig auf alle nicht durch fette Punkte bezeichneten C-Atome des Digitoxins (**6**) verteilt ist. Falls in *Digitalis* aus 1 Mol. D-Glucose nur zwei Mol. Essigsäure gebildet werden, wäre ein Verhältnis der Aktivitäten von Genin:Zucker = 6:1 zu erwarten. Unser Befund spricht also eher für Bildung von drei Mol. Essigsäure, kann aber nicht als strenger Beweis dafür angesehen werden, a) weil durch die genannte unspezifische «Verschmierung» der Aktivität eine merkliche Begünstigung des Zuckers möglich ist; b) weil unbekannt ist, wieviel Essigsäure, Mevalonsäure und andere Vorstufen des Steroidanteils zur Zeit der Injektion bereits vorhanden waren. Falls dieser Anteil im

Verhältnis zur vorhandenen Menge an D-Glucose merklich war, würde durch Verdünnung die relative Aktivität des Geninanteils ebenfalls erniedrigt.

Um die gefundene Aktivität der Ameisensäure (9) richtig zu deuten, sollten vor allem auch noch die Aktivitäten der anderen C-Atome in der Digitoxose (7) (besonders 1–3 sowie 5 und 6) einzeln genau bestimmt werden. Dies war bisher noch nicht möglich. Die Verteilung der Aktivität kann nämlich verschiedene Gründe haben.

Beim Einbau von D-Glucose-[1-¹⁴C] und -[6-¹⁴C] in Cellulose wurde in verschiedenen Pflanzen ungefähr 75% Erhaltung der Markierung und ca. 22% Übertragung ans andere Ende beobachtet (vgl. ANDREWS *et al.* [16] und frühere Lit. daselbst), während die C-Atome 2–5 fast frei von Aktivität blieben. Diese Isomerisierung wird einer teilweisen Äquilibrierung via Triosephosphat zugeschrieben, die aber nicht vollständig sein kann, da sonst 50% Übertragung erfolgen müsste. Ob auch in unserem Fall ein solcher Prozess im Spiele ist, kann nur nach weiteren Experimenten entschieden werden, insbesondere nach genauer Bestimmung der Aktivität an C-1. Falls die von uns isolierte Ameisensäure wirklich vorwiegend aus C-4 stammt, ist die gefundene Aktivität für eine solche Annahme zu hoch. Es besteht daher die Möglichkeit, dass in unserem Fall der folgende Prozess einen wesentlichen Beitrag liefert:

Beim Übergang von Squalen über Lanosterol (3) in 6 werden von den 18 markierten C-Atomen 7 abgespalten, ein Teil davon (Methylgruppen) sicher als C₁-Bruchstücke. Diese 7 C-Atome sollten 58,3% der im Genin 11 noch verbleibenden Aktivität (auf 12 C-Atome konzentriert) enthalten. Nimmt man an, dass diese 7 C-Atome nicht verloren gehen, sondern wieder in D-Glucose übergeführt werden und erneut in den Stoffwechsel eintreten, so ergibt sich folgende summarische Rechnung:

a) Wenn die Aktivität der 7 abgespaltenen C-Atome sich gleichmässig auf alle 6 C-Atome der daraus neu gebildeten D-Glucose (1) und D-Digitoxose (7) verteilen würde, so bekäme jedes C-Atom noch 1/6 der genannten 58,3%, also 9,7% zusätzliche Aktivität. In der entstandenen Digitoxose wäre dann ungefähr die in Tab. 3 angegebene Verteilung an Aktivität zu erwarten.

Tabelle 3. Berechnete und gefundene Aktivitäten für Teilstücke der radioaktiven Digitoxose (7) in % ihrer totalen Aktivität

	Ber. für einzelne C-Atome der Digitoxose			Für Bruchstücke	
	aus verabreichter D-Glucose	aus neu entstandener D-Glucose	in resultierendem Gemisch	Ber.	Gef.
HC=O	0	9,7	6,13		
 CH ₂	0	9,7	6,13		
 HC-OH	0	9,7	6,13		
 HC-OH	0	9,7	6,13	6,13	Ameisensäure 8,45
 HC-OH	0	9,7	6,13	75,5	Acetaldehyd 65,0
 •H ₃	100	9,7	69,33		
Total	100	58,2	100		

b) Bei bevorzugtem Einbau an C-3 und C-4 der Glucose ergäbe sich eine etwas andere Verteilung.

Unter Berücksichtigung der sehr überschlagsmässigen Natur dieser Rechnung und der Tatsache, dass die Fehlergrenze bei der Bestimmung der relativ kleinen Aktivität des Pb-Formiats ziemlich gross ist, kann die Übereinstimmung als befriedigend betrachtet werden. Hier ist auch nicht berücksichtigt, dass in *Digitalis lanata* zur selben Zeit auch noch andere Stoffe, z. B. die Spirostanolglykoside gebildet werden, bei denen ebenfalls radioaktiv markierte Methylgruppen abgespalten, also als C₁-Bruchstücke freigesetzt und zur Resynthese unspezifisch markierter D-Glucose verfügbar werden. Die Biosynthese der Spirostanole erfolgt bei jungen Pflanzen sogar erheblich rascher [7b] als diejenige der Cardenolide.

Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben und Abkürzungen vgl. vorstehende Mitt. [7b]. Ausführung der Papierchromatogramme (Pchr) absteigend nach früherer Vorschrift [17] auf WHATMAN-Nr. 1-Papier, wobei dasselbe mit genau 35% seines Gewichtes an ruhender Phase beladen wurde. Entwicklung der Cardenolide mit KEDDE-Reagens [18] oder 2,4,2',4'-Tetranitrodiphenyl [19], der Digitoxose mit Vanillin-Perchlorsäure [20]. Dünnschichtchromatogramme (Dchr) nach STAHL [21] oder auf Linienglas [22] mit Entwicklung durch Sprühen mit 20-proz. *p*-Toluolsulfonsäure in Alk und anschliessendes Erhitzen auf 110–120°. Xanthidrolreaktion auf Desoxyzucker vgl. [23].

Verabreichung der D-Glucose-[6-¹⁴C] an Digitalis lanata und Bereitung der Rohextrakte. 20 junge «A-Pflanzen» [7a] wurden Ende Juni 1964 einzeln in Töpfe gepflanzt und im Freien unter leichter Schattierung wachsen gelassen. Am 18. Juli 1964 wurden im Laboratorium 11 mg D-Glucose-[6-¹⁴C]² mit total 0,3 mC in 10 ml Leitungswasser mit Hilfe der Fadentechnik genau wie früher beschrieben [7a] aufsaugen gelassen (Dauer ca. 2–6 Std.) und anschliessend mit je 0,5 ml W nachgespült. Die Spüllösung war über Nacht auch völlig aufgesaugt. Hierauf wurden die Fäden entfernt, die Töpfe wieder ins Freie gebracht und wenn nötig gegossen, wobei alle Pflanzen kräftig weiter wuchsen. Am 1. August wurden die Rosetten über dem Wurzelhals abgeschnitten (Gewicht total 660 g) und auf Sieben im aufsteigenden Luftstrom bei 40–50° getrocknet (168 g). Die weitere Verarbeitung geschah genau wie früher beschrieben mit Fermentierung [7a] unter entsprechender Erhöhung der Lösungsmittelmengen. Auf die Bereitung eines Ae- sowie eines Chf-Alk-(2:1)-Extraktes wurde verzichtet und die mit Chf ausgeschüttelte wässrige Phase direkt halb mit Na₂SO₄ gesättigt und mit Chf-Alk-(3:2) ausgeschüttelt. Die erhaltenen Ausbeuten sind in Tabelle 1 angegeben. Bisher wurde erst der Chf-Extr. weiter verarbeitet.

Isolierung des Digitoxins (6). Die 10,5 g Chf-Extrakt (dunkelgrünes Harz) wurden an 250 g Al₂O₃ («WOELM», neutral, Akt. 11–111) nach der Durchlaufmethode chromatographiert; je 100 ml pro Fr.

Die Fr. 1–2 (eluiert mit Be-Chf von 45 und 65% Chf-Gehalt) gaben 1385 mg schwarzgrünes Öl, nicht untersucht.

Die Fr. 3–5 (438 mg, eluiert mit Chf) gaben aus Me-Ae 9 mg krist. Digitoxigenin (11), Smp. 258–262°. Die ML enthielt nach Pchr (System Thf-Be-(1:2)/Fmd) ausser Digitoxigenin noch einen zweiten, nicht identifizierten Stoff, Laufstrecke wie Gitoxin, aber KEDDE-Reaktion rotviolett (statt blauviolett).

Die Fr. 6 (62 mg, eluiert mit Chf) gab aus Me-Ae 4 mg Präp. 1271 (nicht identifiziert), glänzende Körner, Smp. 220–223°, KEDDE-Reaktion positiv, Xanthidrol-Reaktion positiv, Färbung mit 84-proz. H₂SO₄ braun → grau violett. Im Pchr (Thf-Be-(1:2)) R_f = 0,165. Unter gleichen Bedingungen wurden die folgenden R_f-Werte gefunden: Digitoxigenin = 0,79, Digoxigenin = 0,35 und Gitoxigenin 0,53.

Die Fr. 7–8 (134 mg, eluiert mit Chf-Mc-(99:1)) zeigte im Pchr, System Thf-Be-(1:2)/Fmd, entwickelt mit Tetranitrodiphenyl, vier Flecke mit R_f-Werten = 0,76; 0,61; 0,31 und 0,16. Es wurden keine Kristalle erhalten.

Von den Fr. 9–17 (total 989 mg, eluiert mit Chf-Me von 1–11% Me-Gehalt) gaben die Fr. 10–13 (640 mg, eluiert mit 2–4% Me-Gehalt) aus Me-Ae-(1:10) 242 mg reines Digitoxin (6), Smp. 266–

270° (Präp. 1250), sowie 42 mg Kristalle vom Smp. 255–263° und 34 mg vom Smp. 230–245°, die beide im Pchr auch nur den Fleck des Digitoxins gaben. Fr. 14 lieferte 3 mg Kristallgemisch, Smp. 220–230°, das nach Pchr Digitoxin und Gitoxin enthielt. Die ML aller dieser Kristalle und die amorphen Fr. 9 sowie 15–17 wurden vereinigt. Dies Material zeigte im Pchr (Thf-Bc-(1:2)/Fmd, entw. mit Tetranitrodiphenyl) einen Hauptfleck mit $R_f = 0,80$ (Digitoxin) sowie drei schwache Flecke bei $R_f = 0,65; 0,38$ (Gitoxin) und 0,16 (nicht identifiziert).

Die letzten Fr. 18–26 (265 mg, eluiert mit Chf-Me von 15–40% Me-Gehalt) zeigten im Pchr (Thf-Bc-(1:2)/Fmd, entwickelt mit Tetranitrodiphenyl) einen schwachen Fleck bei $R_f = 0,80$ (Digitoxin) und einen starken, nicht identifizierten Fleck bei $R_f = 0,14$.

Das reine Digitoxin (6) (Präp. 1250), farblose Blättchen aus Me-Ae-(1:10), Smp. 266–270°, zeigte im Pchr und im Dchr nur *einen* Fleck und war nach Mischprobe, Pchr, Dchr und Farbreaktionen identisch mit authentischem Material. Radioaktivität vgl. Tabelle 2 sowie Formelseite.

Hydrolyse des radioaktiven Digitoxins (6). 205 mg Präp. 1250 vom Smp. 266–270° wurden in 7,5 ml Me und 7,5 ml 0,1N wässriger H_2SO_4 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde im Vakuum auf 7,5 ml eingengt, mit 7,5 ml W versetzt und 30 Min. auf 60° erwärmt. Hierauf wurde zur Entfernung letzter Methanolreste noch ohne zu wärmen ca. 10 Min. evakuiert, wobei ein Teil des Digitoxigenins auskristallisierte. Es wurde abgenutscht und mehrmals mit kleinen Mengen W gewaschen, bis dieses völlig neutral abließ, und im Vakuum getrocknet: 69 mg, Smp. 240–251°. Die saure wässrige Phase und die Washwasser enthielten nach Pchr neben Digitoxigenin (11) und Digitoxose (7) immer noch etwas Methyl-digitoxosid. Sie wurden daher vereinigt, im Vakuum auf ca. 7 ml eingengt und nochmals $1\frac{1}{2}$ Std. auf 68° erwärmt. Dann wurde zweimal mit je 20 ml Chf-Ae-(1:3) ausgeschüttelt. Die mit wenig W, Sodalösung und W gewaschenen Auszüge gaben nach dem Trocknen und Eindampfen noch 45 mg rohes Genin. Aus An-Ae noch 8 mg Kristalle vom Smp. 220–240°.

Die saure wässrige Phase und das erste Washwasser wurden vereinigt, im Vakuum von Chf-Resten befreit und mit frisch aus $Ba(OH)_2$ -Lösung mit CO_2 gefälltem und mit heissem Wasser gewaschenem $BaCO_3$ heiss neutralisiert und durch ein gehärtetes Filter genutscht. Das klare Filtrat wurde mit ca. 2 mg frischem $BaCO_3$ versetzt¹⁰ und im Vakuum ganz eingedampft. Der Rückstand wurde bei 0,03 Torr und 20° kurz getrocknet, in reinstem An aufgenommen, filtriert und das klare Filtrat im Vakuum eingedampft. Der farblose Rückstand (110 mg) gab aus An-Ae-(4:1) nach Impfen 70 mg krist. Digitoxose (Präp. 1252), Smp. 115–117°. Nach Mischprobe, Pchr und Farbreaktion identisch mit authentischer Digitoxose.

Weitere 100 mg radioaktives Digitoxin (6) (davon 24 mg Präp. 1250, 42 mg Kristalle vom Smp. 255–263° und 34 mg Kristalle vom Smp. 230–245°) wurden analog gespalten. Sie lieferten 48 mg rohes Genin und daraus 4 mg reine Kristalle (Präp. 1251), Smp. 250–257°, sowie 50 mg rohen Zuckersirup und daraus 20 mg reine Digitoxose, Smp. 115–117° (Präp. 1252). Radioaktivitäten vgl. Tabelle 2. Die ML des Digitoxins wurden hier nicht weiter verarbeitet.

Abbau der radioaktiven Digitoxose (7) mit $NaJO_4$. 56 mg Digitoxose (es wurden die ML der Kristalle aus beiden Versuchen verwendet, die aber im Dchr nur den Fleck der Digitoxose zeigten und noch weitgehend kristallisiert waren) wurden mit 500 mg $NaJO_4$ und 500 mg H_5JO_6 in 6 ml W auf 45° erwärmt. Dabei wurde langsam CO_2 durchgeleitet und das abziehende Gas durch eine frisch filtrierte und auf 0° gekühlte Lösung von 150 mg *p*-Nitrophenylhydrazin-chlorhydrat in 5 ml W geleitet. Die Abscheidung eines gelben Niederschlages begann langsam, als die Temperatur des Reaktionsgefäßes 40° erreicht hatte, und war nach 2 Std. bei 45° beendet. Der gelbe Niederschlag wurde abgenutscht, mit W gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 44,5 mg (= 65,8%), Smp. 125–126,5°. Umkristallisieren aus Be-Ae gab 28 mg reinstes Präp. Nr. 1253, in orangegelben Nadeln, Smp. 128–129°, Radioaktivität vgl. Tabelle 2.

Das im Kolben verbliebene Reaktionsgemisch wurde bei 30° und 12 Torr zur Trockne gedampft, wobei die flüchtigen Teile (Wasser usw.) bei –80° ausgefroren wurden. Hierauf wurde der Rückstand mit 2 ml W versetzt, erneut in gleicher Weise destilliert und dies noch zweimal wiederholt, worauf das letzte ausgefrorene Destillat keine saure Reaktion mehr zeigte. Die Destillate wurden aufgetaut, vereinigt, mit wenig Me nachgespült und mit frisch bereitetem feuchtem Pb-

¹⁰) Diese Vorsichtsmassnahme ist nötig, wenn man vermeiden will, dass sich aus Spuren vorhandener Schwefelsäure-ester beim Eindampfen freie H_2SO_4 bildet, welche die Digitoxose völlig zerstört.

Carbonat heiss neutralisiert. Es wurde heiss filtriert und das klare Filtrat im Vakuum auf ca. 5 ml eingengt. Eine letzte flockige Fällung wurde durch Filtration entfernt und die völlig klare Lösung auf 1 ml eingengt, wobei das Pb-Formiat in farblosen Nadeln kristallisierte. Es wurde abgutscht, mit wenig W, dann mit Me gewaschen. Ausbeute 10,9 mg Präp. TR-1254. Das Präparat zeigte, wie authentisches Pb-Formiat, keinen Smp., sondern färbte sich beim Erhitzen bei ca. 265–270° unter Zersetzung schwarz. Radioaktivität vgl. Tabelle 2. Von wasserlöslichen und mit W überdestillierenden Säuren gibt nur Ameisensäure ein in W so schwer lösliches und in farblosen Nadeln kristallisierendes Pb-Salz.

Aus den ML des Pb-Formiats wurden nach starkem Einengen im Vakuum und Zusatz von Me noch 14,5 mg eines anderen Pb-Salzes (Präp. 1272) erhalten: kompakte Kristallkörner, Smp. 263–265° (wird dabei richtig flüssig), dessen Reinheit unsicher ist und das noch nicht identifiziert wurde.

SUMMARY

Strongly radioactive digitoxin (**6**) could be isolated (without dilution) in crystalline form from young plants of *Digitalis lanata* after their inoculation with D-Glucose-[6-¹⁴C] using the wick method. Hydrolytic cleavage of this digitoxin gave digitoxigenin (**11**) and D-digitoxose (**7**), both being isolated in crystalline form (without dilution). The genin was found to be 4 times more active, pro mole, than the digitoxose. This can be best explained when one assumes that the plant converts 1 mole of D-glucose into 3 moles of acetic acid. After degradation of the digitoxose using NaJO₄, acetaldehyde (as the crystalline *p*-nitrophenylhydrazone) and formic acid (as the Pb salt) could be isolated. The acetaldehyde carried 65% and the formic acid 8,45% of the activity of the digitoxose. This is compatible with the assumption that digitoxose is formed in the plant from D-glucose without re-arrangement of the carbon chain. The appreciable activity of the formic acid could be derived from the relatively large proportion of radioactivity lost (ca. 38,9%), partly in the form of C₁-subunits, in the transformation of the intermediary lanosterol into digitoxigenin. This lost activity may be incorporated in unspecifically labelled D-glucose which then re-enters the biosynthetic pathway

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] ANNA F. KRASSO & EK. WEISS, *Helv.* **49**, 1113 (1966).
- [2] T. REICHSTEIN & EK. WEISS, The Sugars of the Cardiac Glycosides, *Advances Carbohydrate Chemistry* **17**, 65–120 (1962).
- [3] T. REICHSTEIN, a) *Angew. Chem.* **74**, 887 (1962); b) *Chimia* **17**, 164 (1963); c) *Naturwiss.* **53** (1966), im Druck.
- [4] H. KILIAN, *Arch. Pharm.* **233**, 311 (1895); **234**, 481 (1896); *Ber. deutsch. chem. Ges.* **31**, 2454 (1898); **55**, 88 (1922), und frühere Lit. daselbst sowie bei MICHEEL [5].
- [5] F. MICHEEL, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **63**, 347 (1930).
- [6] B. ISELIN & T. REICHSTEIN, *Helv.* **27**, 1203 (1944); M. GUT & D. A. PRINS, *Helv.* **30**, 1223 (1947); H. R. BOLLIGER & P. ULRICH, *Helv.* **35**, 93 (1952).
- [7] J. v. EUW & T. REICHSTEIN, a) *Helv.* **47**, 711 (1964); b) *ibid.* **49**, 1468 (1966).
- [8] V. S. WARAVDEKAR & L. D. SASLAW, *J. biol. Chemistry* **234**, 1945 (1959).
- [9] C. F. HUEBNER, S. R. AMES & E. C. BUBL, *J. Amer. chem. Soc.* **68**, 1621 (1946); P. FLEURY, *Bull. Soc. chim. France* [5] **22**, 1126 (1955).
- [10] J. C. P. SCHWARZ & M. MACDOUGALL, *J. chem. Soc.* **1956**, 3065; M. CANTLEY, L. HOUGH & A. O. PITTET, *Chemistry & Ind.* **37**, 1253 (1959), und frühere Lit. daselbst.
- [11] E. STAPLE in P. BERNFIELD, Edit., *Biosynthesis of Natural Compounds*, Pergamon Press, Inc., New York 1963.

- [12] D. D. DAVIS, J. GIOVANELLI & T. A. P. REES, *Plant Biochemistry*, Blackwell Scientific Publ., Oxford 1964.
- [13] G. E. W. & M. WOLSTENHOLME & M. CONNOR, *Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Steroids*, J. & A. Churchill Ltd., London 1959; H. H. RICHARDS & J. B. HENDRICKSON, *The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins*, W. A. Benjamin, Inc., New York 1964; J. FRUTON & S. SIMMONDS, *General Biochemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, London 1958.
- [14] F. LEUTHARDT, *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*, 14. Aufl., W. de Gruyter, Berlin 1961.
- [15] E. RAMSTAD & J. L. BEAL, *Chemistry & Ind.* 1960, 177; H. GREGORY & E. LEETE, *ibid.* 1960, 1242; E. G. GROS & E. LEETE, *ibid.* 1963, 698; *idem.*, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 3479 (1965); R. TSCHESCHE & G. LILLENWEISS, *Z. Naturforsch.* 19b, 265 (1964).
- [16] P. ANDREWS, L. HOUGH & J. M. PICKEN, *Phytochemistry* 4, 751 (1965).
- [17] O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 108 (1951); F. KAISER, *Chem. Ber.* 88, 556 (1955).
- [18] D. L. KEDDE, *Pharmac. Weekbl.* 82, 741 (1947).
- [19] R. MAULI, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 40, 284 (1957).
- [20] A. P. MACLENNAN, H. M. RANDALL & D. W. SMITH, *Analyt. Chemistry* 31, 2020 (1959).
- [21] E. STAHL, *Angew. Chem.* 73, 646 (1961).
- [22] A. GAMP, P. STUDER, H. LINDE & K. MEYER, *Experientia* 18, 292 (1962).
- [23] M. PESEZ, *Ann. pharmaceut. franç.* 10, 104 (1952), und frühere Lit. daselbst.

171. Über die Reaktion substituierter Thioxanthenoxide mit Säuren

von O. Schindler, W. Michaelis und R. Gauch

(20. IV. 66)

Die Oxydation von 9-[(N-Methyl-3'-piperidyl)-methyl]-thioxanthen-hydrochlorid (V-Hydrochlorid) mit Peressigsäure lieferte zwei stereoisomere Sulfoxide (I) [1]. Die Isomerie beruht auf der verschiedenen Lage des Sauerstoffatoms der Sulfoxidgruppe zur basischen Seitenkette an C-9 [2]. Im folgenden wird über die Reaktion dieser Sulfoxide mit konz. Salzsäure oder Acetanhydrid berichtet.

In analytischen Vorversuchen mit den reinen Isomeren hatte sich gezeigt, dass bei beiden die Reaktion gleich verläuft. Als Ausgangsmaterial diente deshalb das kristallisierte Gemisch der beiden Stereoisomeren I, das, wie sich aus dem Dünnschichtchromatogramm abschätzen liess, rund 75% des Isomeren A [2] und 25% des Isomeren B [2] enthält.

Siedende konz. Salzsäure lieferte ein Produkt, dessen Papierchromatogramm vier neue Komponenten (A, B, C und D nach absteigendem Rf-Wert geordnet) zeigte. D liess sich aus dem Gemisch der Basen durch Kristallisation isolieren, C konnte aus der Mutterlauge durch Adsorptionschromatographie an Al_2O_3 unvollständig, aber rein abgetrennt werden; die dabei erhaltenen Mischfraktionen, bestehend aus A und B mit wenig C, wurden durch Verteilungschromatographie aufgetrennt. A, B und D konnten als Basen, A, B und C als Hydrochloride kristallisiert werden. Ausbeute an reinen Reaktionsprodukten: *Subst. A* 15,5%; *Subst. B* 64%; *Subst. C* 5,1%; *Subst. D* 12,7%.

In siedendem Acetanhydrid entstand ein chromatographisch einheitliches Reaktionsprodukt, das nach Smp., Misch-Smp. und IR.-Spektrum der obigen Komponente B entsprach.