

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ière communication: L. CHARDONNENS & G. GAMBA, *Helv.* 49, 997 (1966).
 [2] W. DEUSCHEL, *Helv.* 34, 168 (1951).
 [3] L. CHARDONNENS & J. RODY, *Helv.* 42, 1328 (1959).
 [4] L. CHARDONNENS & R. RITTER, *Helv.* 33, 393 (1955).
 [5] O. GRUBER & R. OBERKOBUSCH, *Chem. Ber.* 85, 433 (1952).
 [6] W. HAMMER, T. STAUNER & L. CHARDONNENS, *Helv.* 49, 1723 (1966).
 [7] I.G. FARBENINDUSTRIE A.G., *Brit. P.* 459108 (1936); *Chem. Zbl.* 1937 II, 2262.

221. Adigosid, Strukturbestimmung¹⁾Glykoside und Aglykone, 282. Mitteilung²⁾

von St. Hoffmann, Ek. Weiss und T. Reichstein

(24. VI. 66)

1. *Problemstellung.* Die Samen des roten Oleanders, *Nerium oleander* L. (*Apocynaceae*) enthalten ein kompliziertes Gemisch von Cardenolidglykosiden. JÄGER *et al.* [2] konnten nach Fermentierung 28 solcher Stoffe darin nachweisen und 19 davon in Kristallen isolieren. Von diesen liessen sich 13 mit bekannten Verbindungen identifizieren; die 6 weiteren waren neu. Bei den letzteren konnte in vier Fällen die Struktur ermittelt werden; es verblieben zwei nicht völlig aufgeklärte Stoffe, nämlich Subst. A und Adigosid. Subst. A war ein autoxydables Dienon, das nicht weiter untersucht wurde. Interessanter war Adigosid. Bei diesem Stoff wurden früher die folgenden Beobachtungen gemacht, die sich aber zu keinem wirklich passenden Formelbild vereinigen liessen.

2. *Frühere Befunde.* Die Analyse passte ungefähr auf die Formel $C_{30}H_{46}O_8$. Die KEDDE- [3]³⁾, KELLER-KILIANI- [4]⁴⁾ und die Xanthydroly-Reaktion [5]⁵⁾ waren positiv, ebenso die Fluoreszenz-Reaktion mit $SbCl_3$ [6]⁶⁾. Das UV.-Absorptionsspektrum (vgl. Fig. 16 bei [2]) zeigte das Maximum des Butenolidringes bei 215 nm⁷⁾, dessen Intensität ($\log \epsilon = 4,09$ für obige Formel berechnet) zwar zu gering war, dessen Lage aber dafür sprechen könnte, dass Adigosid als Aglykon ein Derivat des Gitoxigenins mit acetylierter Hydroxylgruppe an C-16 enthalten könnte. Dafür sprach auch

¹⁾ Auszug aus der Diss. St. HOFFMANN, Basel 1966.

²⁾ 281. Mitteilung: R. BRANDT *et al.* [1].

³⁾ Diese Reaktion gibt mit allen Butenoliden eine violette Färbung.

⁴⁾ Diese Reaktion ist positiv bei allen 2-Desoxyzuckern und ihren Glykosiden, soweit sie im Zuckerrest nicht acetyliert sind und dort keinen zusätzlichen Glucoseresst oder anderen in 2-Stellung hydroxylierten Zuckerrest tragen. In den letztgenannten Fällen ist die Reaktion meistens negativ oder unsicher.

⁵⁾ Diese Reaktion ist positiv bei 2-Desoxyzuckern und ihren Glykosiden, auch wenn letztere noch zusätzliche Glucose- oder andere Zuckerreste tragen. Durch Acetylierung im Zuckeranteil wird sie deutlich schwächer, bleibt aber positiv.

⁶⁾ Diese Reaktion ist positiv bei allen 14 β -Hydroxycardenoliden, die in 16-Stellung noch eine Hydroxy- oder Acyloxygruppe oder eine Doppelbindung tragen.

⁷⁾ Normale Cardenolide (wie Digitoxigenin usw.) zeigen das Maximum bei 217 nm ($\log \epsilon = 4,20-4,22$). Bei 16 β -Acetoxycardenoliden wird es nach ca. 215 nm verschoben [7], während es bei freiem Gitoxigenin bei ca. 219 nm liegt [8].

die Tatsache, dass Adigosid mit 84-proz. H_2SO_4 eine praktisch gleiche Färbung gab wie Nerigosid (Formel wie **1** aber 16-ständige HO-Gruppe acetyliert), was auf ein ähnliches Aglykon deutet. Ferner lieferte Adigosid mit konz. HCl [9] [10] ein Produkt, das im UV. neben dem Maximum des Butenolidringes noch dasjenige der $\Delta^{14,16,20:22}$ -Cardatrienolid-Gruppierung zeigte mit $\lambda_{\text{max}}^{\text{alk}} = 335 \text{ nm}^8$). Adigosid lieferte nach milder saurer Hydrolyse einen Zucker, der nach Papierchromatogramm identisch war mit Diginose, und ein äusserst schwach polares Aglykon, das im damals verwendeten System gleich lief wie Adynerigenin [11]. Auch die Glykoside Adynerin und Adigosid zeigten im Papierchromatogramm sehr ähnliche Laufstrecken⁹). Es wurde damals vermutet, sie könnten auch chemisch nahe verwandt sein. Dies hat sich nicht bestätigt. Wir beschreiben hier die Strukturermittlung.

3. *Isolierung von Adigosid*. Die grösste Schwierigkeit für die Untersuchung bereitete die Gewinnung des nötigen Materials. Es wurden wieder Samen verwendet¹⁰). Diese enthalten kein Adynerin, während in den holzigen Fruchtschalen kein Adigosid, dafür aber relativ viel Adynerin vorkommt [11]. Wie schon JÄGER *et al.* [2] feststellten, ist die Isolierung von Adigosid nur durch Kombination verschiedener chromatographischer Methoden möglich, wobei mindestens eine Verteilungschromatographie nötig ist. Als Ausgangsmaterial verwendeten wir 1,3 kg reine, reife Samen¹¹). Sie lieferten nach früher beschriebener Methode [12] (mit Fermentierung) die in Tab. 1 genannten Rohextrakte.

Tabelle 1. Ausbeuten und Zusammensetzung der rohen Extrakte aus 1,3 kg Samen

Art des Extraktes	Ausbeute		Flecke im Papierchromatogramm Bezeichnung nach JÄGER <i>et al.</i> [2]
	in g	in %	
Pe-Extr.	145	11,15	nicht untersucht
Ae-Extr.	16,2	1,25	(α), A, (β), B, γ , C, δ , D, E, F, G, H, I, K, L
Chf-Extr.	9,1	0,70	frei von B, nicht weiter untersucht

Entwicklung mit KEDDE-Reagens [3]. In Klammern schwache Flecke.

α = unbekannt, A = vermutl. Dienon, β = unbekannt, B = Adigosid, γ = Digistrosid, C = Oleandrin, δ = Cryptograndosid A, D = 16-Anhydro-desacetyl-cryptograndosid A, E = Odorosid A, F = Nerigosid, G = 16-Anhydro-desacetyl-nerigosid, H = Digitoxigenin, I = Oleandrigenin, K = Desacetyl-oleandrin, L = Desacetyl-cryptograndosid A.

Zum Nachweis im Pchr. (Ausführung absteigend) dienten die von JÄGER *et al.* [2] verwendeten Systeme Bc-Cy-(1:1)/Fmd (Beladung des Papiers: 33% des Papiergewichtes) und Be/Fmd (33% Beladung) sowie im Dchr. die Systeme Cy-iPr-(7:3) [11]

⁸) Diese Reaktion geben alle 14β -Hydroxycardenolide mit zusätzlicher Hydroxy- oder Acyloxygruppe in 16-Stellung oder einer zusätzlichen Δ^{16} -Doppelbindung.

⁹) Zur Unterscheidung sind aber die in Tabelle 2 genannten Systeme geeignet.

¹⁰) Ob Adigosid auch in den Blättern vorkommt, ist unbekannt; diese enthalten aber etwas Adynerin.

¹¹) Gesammelt von Herrn E. HAUSER, damals in Gargnano, im Febr. 1960, am Westufer des Gardasees, wo die Pflanzen teils kultiviert, teils verwildert unweit der Strasse wachsen und reichlich fruchten. – Wir danken Herrn HAUSER für die Beschaffung des Materials und die recht mühsame Trennung von Samen und Fruchtschalen.

¹²) Abkürzungen vgl. Einleitung zum Exper. Teil.

¹³) Auf die Gewinnung von Chf-Alk-Extrakten, welche die stärker polaren Anteile enthalten, wurde hier verzichtet.

und Cy-iPr-(4:1) an Kieselgel G¹²⁾. Zur Differenzierung von Adigosid und Adynerin und der Genine Adigenin und Adynerigenin im Pchr. ist System Be-Cy-(3:2)/Pgl (33% Beladung) [11] geeignet; vgl. Tabelle 2.

Tabelle 2. Unterscheidung von Adynerin, Adigosid, Adynerigenin und Adigenin

System	Laufzeit	Relative Laufstrecke ¹⁴⁾	
Pchr. Be-Cy-(3:2)/Pgl	4 Std.	Adynerin: Adigosid	1,56
Pchr. Be-Cy-(3:2)/Pgl	10 Std.	Adynerigenin: Adigenin	2,01
Dchr. Cy-iPr-(7:3)	2 Std.	Adynerin: Adigosid	0,49
Dchr. Cy-iPr-(4:1)	2 Std.	Adynerigenin: Adigenin	0,45

In beiden Fällen findet zwischen Pchr. und Dchr. somit eine Umkehrung der relativen Laufstrecken statt.

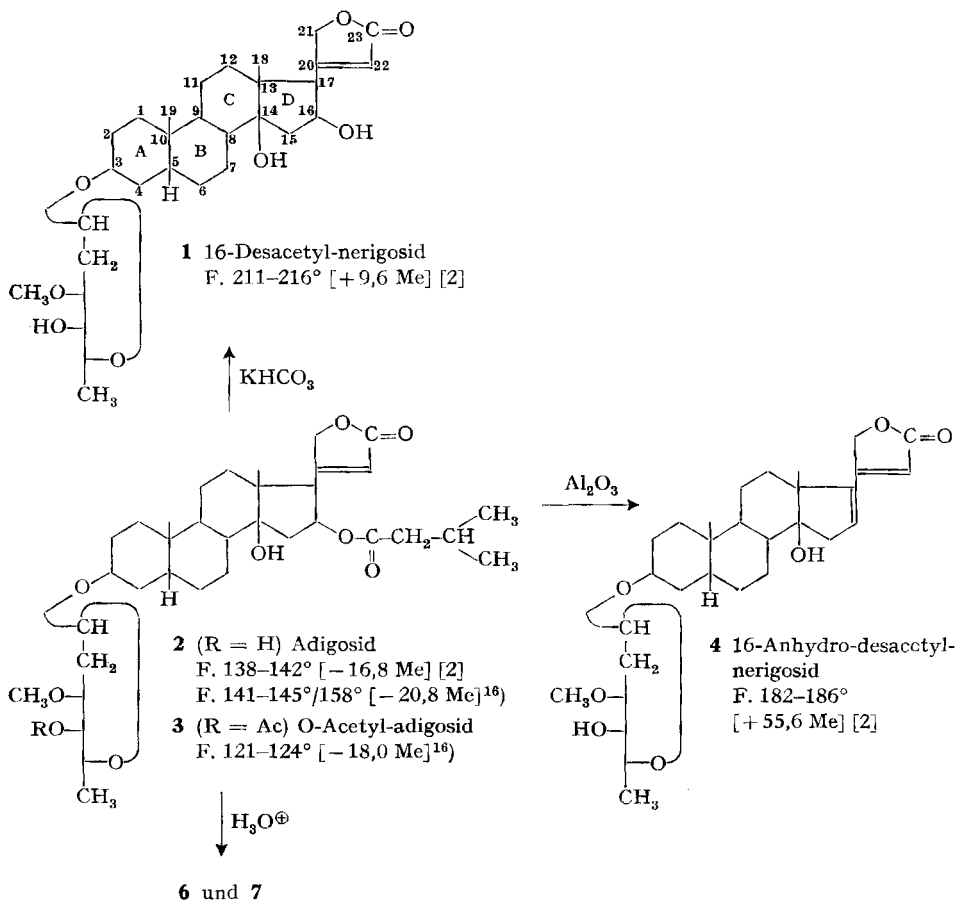
Da Adigosid (Fleck B) nur im Ae-Extrakt nachgewiesen werden konnte, haben wir nur diesen Teil präparativ getrennt. Nach Vorversuchen erwies sich folgendes Verfahren als erfolgreich: Die 16,2 g Material wurden zunächst einer normalen Chromatographie an SiO₂ unterworfen, wobei sich das gesamte B in einem Konzentrat (2,36 g) anreichern liess, das ausserdem noch die Stoffe α -F enthielt. Dieses Konzentrat wurde an viel feinem SiO₂ nach DUNCAN [13] chromatographiert, wobei sich alles B in einem zweiten Konzentrat (709 mg) anreichern liess, das daneben nur noch (α), (A), (β), C und E enthielt. Dieses Gemisch wurde durch Verteilungschromatographie an Fmd auf Cellulose (Fliessmittel: Be-Cy-(1:1)) in 207 Fraktionen getrennt, wobei sich ein Teil des Adigosid (49,6 mg) bereits in reinen Kristallen abtrennen liess. Der Rest lag als Gemisch mit C vor, das teilweise noch Spuren β und E enthielt. Dieses Gemisch wurde erneut an SiO₂ nach DUNCAN (Fliessmittel: Chf-iPr-(96:4)) getrennt, worauf nochmals 217 mg reines Adigosid in Kristallen isoliert werden konnten. Das jetzt noch verbleibende Gemisch (104 mg) wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie [14] [15] unter Verwendung von 3,5-Dihydroxy-pyren-8,10-disulfonsaurem Natrium als Fluoreszenzindikator [16]¹⁵⁾ getrennt, wobei noch 52,6 mg reines Adigosid erhalten wurden. Die totale Ausbeute an reinen Kristallen betrug somit 320 mg = 0,0246%. Wir schätzen, dass die verwendeten Samen etwa 450 mg = 0,035% enthalten haben. Die Eigenschaften des neuen Präparates entsprachen gut den früheren Angaben [2]; die neuen Kristalle zeigten lediglich meistens einen Doppel-Smp.

4. *Konstitutionsermittlung.* Mit Hilfe des nun reichlich vorhandenen Materials liess sich zeigen, dass Adigosid Formel 2 besitzt. Diese stützt sich auf folgende Befunde: Das mit der Methode von ARDENNE [17] unter geeigneten Bedingungen aufgenommene Anionen-Massenspektrum (Fig. 1) zeigte eine kleine, aber deutliche Spitze bei $m/e = 617$ entsprechend $M - 1$. Die Deutung der weiteren stärkeren Spitzen ist auf Grund der Formel 2 leicht möglich (vgl. Fig. 1), auch wenn die vermutete elementare Zusammensetzung der zugehörigen Ionen nicht bewiesen ist. Auch die früher ausgeführte Analyse passt gut auf die Bruttoformel C₃₅H₅₄O₉ (618,78). Sie erklärt auch die Befunde der Spektren. Die Lage des Maximums im UV. bei 215 nm wird gut ver-

¹⁴⁾ Mittelwert aus 3 Bestimmungen. Erfahrungsgemäss sind Rf-Werte weniger gut reproduzierbar im Gegensatz zum Rf-Wert-Verhältnis (relative Laufstrecke).

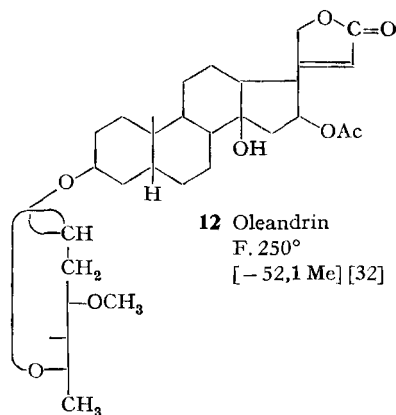
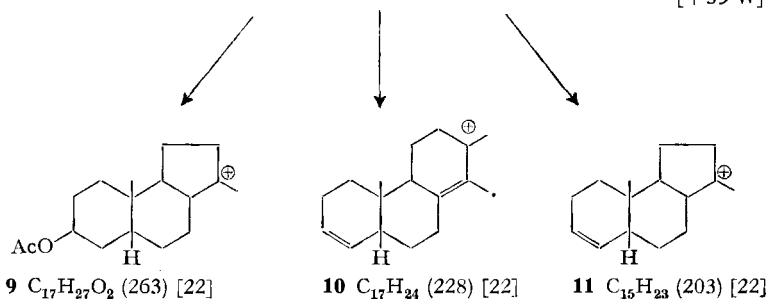
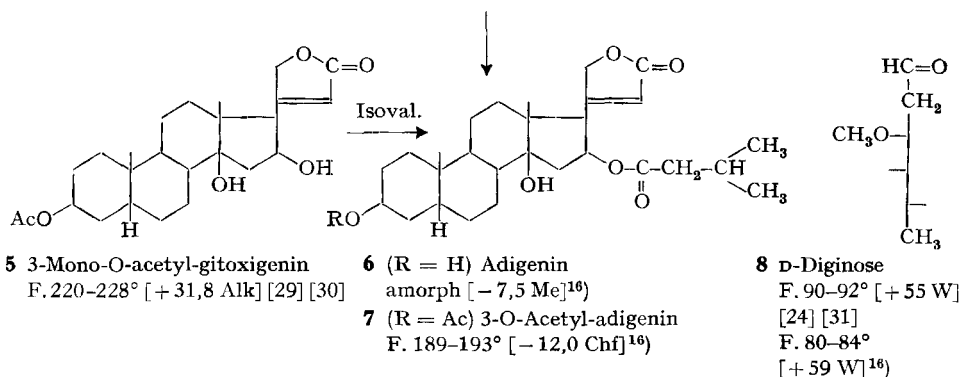
¹⁵⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. S. PETERSEN, FARBENFABRIKEN BAYER A.G., Leverkusen, besonders für die Überlassung des Indikators.

ständig⁷⁾ und für die Intensität berechnet sich jetzt der relativ gut passende Wert $\log \epsilon = 4,16$; auch die Abwesenheit einer Acetoxybande bei ca. 8μ im IR.-Spektrum (Fig. 18 bei [2]) wird verständlich. Die Acetylierung von Adigosid **2** lieferte das krist. Mono-O-acetyl-derivat **3** ($C_{37}H_{56}O_{10}$), dessen IR.-Spektrum in CCl_4 (Fig. 3) noch eine schwache, aber deutliche HO-Bande bei $2,77$ – $2,78 \mu$ zeigte und eine scharfe Acetoxybande bei $8,12 \mu$. Im NMR.-Spektrum (Fig. 6) fallen die Signale der zwei angulären Methylgruppen zusammen, die Signale der drei sekundären Methylgruppen (Zucker und Isovalerylrest) sind nur teilweise getrennt. Sehr deutlich ist je ein Signal der Acetyl- sowie der Methoxy-Gruppe. Durch Kontakt mit Al_2O_3 wird beim Adigosid (**2**) die 16-ständige Isovaleryloxygruppe teilweise abgespalten [18]. Der dabei entstehende Stoff (vermutlich **4**) zeigte im Pchr. dieselbe Laufstrecke wie 16-Anhydro-desacetyl-nerigosid (**4**); das Rohprodukt gab zudem im UV. ein Maximum in der richtigen Lage bei 270 nm . Ferner lieferte Adigosid bei milder alkalischer Verseifung mit $KHCO_3$ in wässrigem Me [19] einen stärker polaren Stoff, der nach Pchr. mit Desacetyl-nerigosid (**1**) identisch war.



¹⁶⁾ Exper. Teil dieser Arbeit.

2 und 3



Die Zahlen in grossen eckigen Klammern geben die spez. Drehung für Na-Licht in den vermerkten Lösungsmitteln¹⁶⁾ an.

Die genannten Reaktionen wurden alle im Mikromaßstab ausgeführt. Um die Struktur eindeutig zu beweisen wurde Adigosid (2) zunächst einer milden sauren Hydrolyse [20] unterworfen. Der Zucker wurde in krist. Form erhalten und eindeutig mit D-Diginose (8) identifiziert. Der rohe Geninteil war ein Gemisch, das nach Pchr. neben dem Hauptprodukt 6 noch eine kleine Menge (ca. 5-6%) 16-Anhydro-gitoxigenin [21] enthielt. Durch Chromatographie an SiO₂ liess sich Adigenin (6) daraus in reiner Form erhalten, kristallisierte aber bisher nicht. Das amorphe Präparat zeigte im UV. wieder ein Maximum bei 215 nm (log ε = 4,13). Durch Acetylierung wurde jedoch das gut kristallisierte 3-O-Acetyl-adigenin (7) (Präp. STH 4) gewonnen, das

für die endgültige Strukturabklärung besonders geeignet war. Analyse, Massenspektrum (Fig. 2), IR.-Spektrum (Fig. 4 und 5) und Protonenresonanzspektrum (Fig. 7) passen gut auf die angegebene Formel **7** ($C_{30}H_{44}O_7 = 516,65$). Besonders aufschlussreich war das Massenspektrum (Fig. 2). Die Molekelspitze bei $m/e = 516$ ist erwartungsgemäss nur schwach. Die weiteren Spitzen bei $m/e = 456, 432, 414, 396, 372, 354$ und 336 sind aus der Formel **7** leicht verständlich (versuchsweise Zuordnung vgl. bei Fig. 2), auch wenn die vermutete Zusammensetzung der entsprechenden Ionen nicht durch genaue Vermessung der Massenzahlen bewiesen werden konnte. Von diagnostischem Wert sind weiter besonders die zwei starken Spitzen bei $m/e = 203$ und 228 . Gleiche Spitzen wurden beim Digitoxigenin gefunden und von SPITELLER [22] als **11** und **10** gedeutet. Sie treten nicht nur beim Digitoxigenin, sondern bei allen 14β -Hydroxycardenoliden auf, die an den Ringen A, B und C ausser der 3-ständigen RO-Gruppe keine weiteren Substituenten tragen. Das Auftreten dieser zwei Spitzen hat uns zuerst auf die Spur der richtigen Formel geführt. Dementsprechend dürfte die schwache Spitze bei $m/e = 263$ vermutlich dem Ion **9** entsprechen.

5. *Teilsynthese.* Die angegebene Formel **7** liess sich durch Teilsynthese bestätigen. Das bekannte 3-Mono-O-acetyl-gitoxigenin (**5**) wurde zu diesem Zweck mit Isovalerylchlorid in Py umgesetzt. Das nach chromatographischer Reinigung in Kristallen erhaltene Reaktionsprodukt (Präp. STH 6) war nach Smp., Misch-Smp., Drehung, Dchr. und IR.-Spektrum (Fig. 5) mit dem Naturprodukt identisch. Das analog bereitete 16-O-*n*-Valeryl-Derivat zeigte zwar im Dchr. und Pchr. ebenfalls gleiche Laufstrecken wie das natürliche **7**, blieb aber auch nach Animpfen mit **7** amorph.

6. *Isolierung des Isovalerylrestes als Isovaleriansäureanilid.* 3-O-Acetyl-adigenin (**7**) zeigt beim Schmelzen teilweise Umwandlungen. Ausserdem ist auch bekannt, dass Isovaleriansäurederivate häufig mit analogen Derivaten der *n*-Valeriansäure oder der Methyläthyllessigsäure isomorph sind. Aus den Spektren ist ausserdem nicht mit Sicherheit ersichtlich, dass es sich bei dem Valerylrest tatsächlich um Isovaleriansäure und nicht um eine genannte isomere Säure handelt¹⁷⁾. Um dies sicherzustellen, wurde eine Probe Adigenin (**6**) mit Anilin gekocht. Dabei wird der Valerylrest weitgehend ins Anilid übergeführt. Dieses liess sich aus dem entstandenen Gemisch durch Chromatographie in Kristallen isolieren und durch Mischprobe sowie IR.-Spektrum mit authentischem Isovaleriansäureanilid identifizieren. Es ist bekannt, dass die Anilide von Isovaleriansäure, Methyläthyllessigsäure und *n*-Valeriansäure nicht isomorph sind und bei der Mischprobe Schmelzpunktsdepressionen geben. Das erwähnte Experiment beweist somit eindeutig, dass im Adigosid (**2**) wirklich ein Isovalerylrest vorliegt.

7. *Konfiguration der Verknüpfung.* Aus den molekularen Drehungen von Adigosid (**2**), $\phi = -116^\circ \pm 12^\circ$ (in Me), und Adigenin (**6**), $\phi = -35,5^\circ \pm 12^\circ$ (in Me), ergibt sich für den Zuckerteil ein Drehungsbeitrag von $A\phi = -80,5^\circ \pm 24^\circ$. Dies spricht stark dafür, dass die D-Diginose entsprechend der Regel von KLYNE [23] β -pyranosidisch gebunden ist. Für α -Methyl-D-diginopyranosid wurde früher gefunden $\phi = +143,3^\circ \pm 4^\circ$ (in An) [24], und daraus berechnet sich für β -Methyl-D-diginopyranosid $\phi = \text{ca.} -206^\circ$.

¹⁷⁾ Das isomere Derivat mit *n*-Valerylrest wurde teilsynthetisch bereitet. Es konnte auch nach Impfen mit 3-O-Acetyl-adigenin nicht kristallisiert werden. In allen bisher geprüften Systemen zeigte es im Pchr. dieselbe Laufstrecke wie 3-O-Acetyl-adigenin.

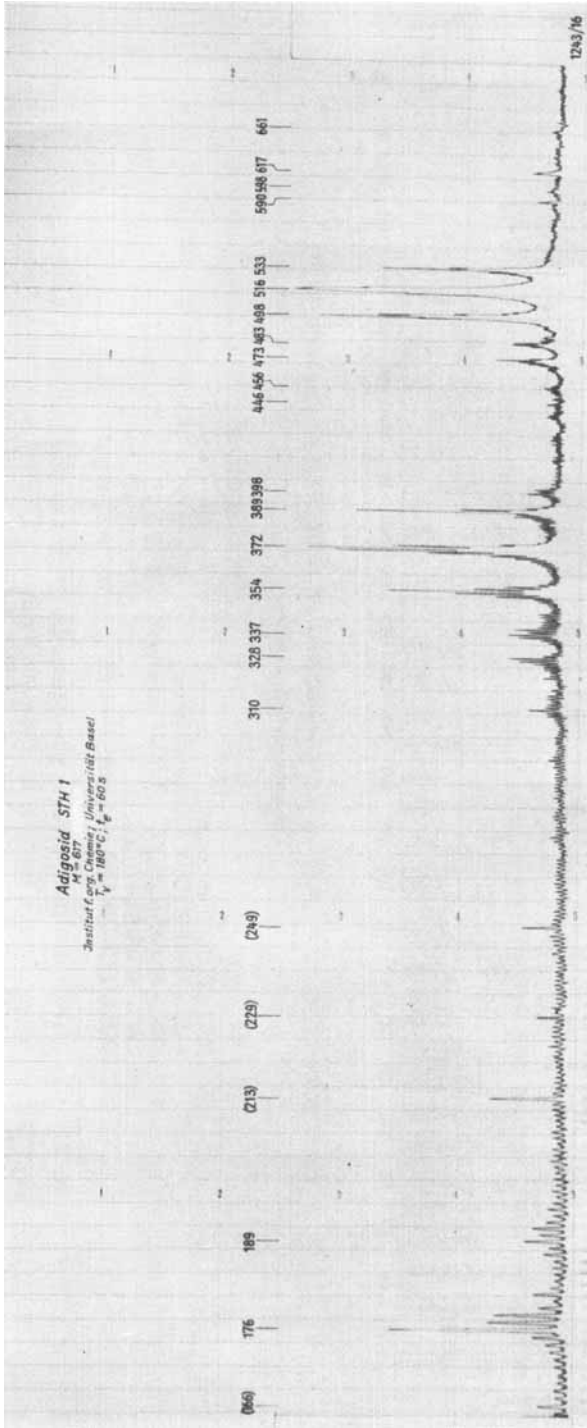


Fig. 1. Anionen-Massenspektrum von Adigosid (2) (Präp. STH 1), Smp. 141–145°/158° 18)

Unter Zugrundelegung der Formel 2 ergibt sich folgende versuchsweise Zuordnung: 617 = *M*-1; 533 = *M*-85 (entspr. Desacetyl-nerigosid (1)-1, bzw. Verlust von Isovalerylium-Kation); 516 = *M*-102 (entspr. 4, Verlust von Isovaleriansäure); 498 = 516-18 (H_2O); 473 = *M*-144-1 (entspr. Adigenin (6)-1, bzw. Verlust des Diginosyl-Kations); 389 = *M*-85-144 (entspr. Gitoxigenin-1); 372 = *M*-144-102 (entspr. 16-Anhydro-gitoxigenin); 354 = 372-18 (entspr. Di-anhydro-gitoxigenin).

18) Ausgeführt im Forschungsinstitut MANFRED V. ARDENNE, Dresden - Weisser Hirsch, unter Registrierung der Anionen nach früher beschriebener Methode [33] [34].

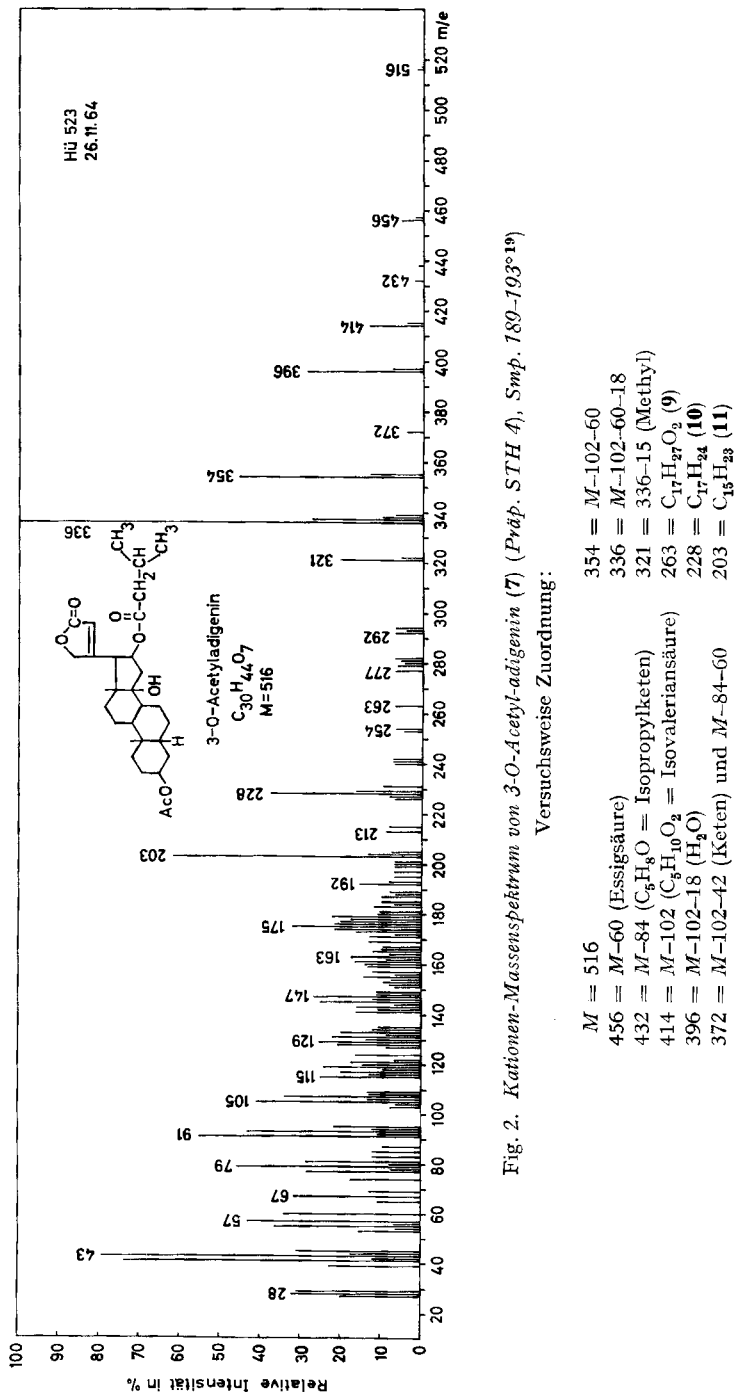


Fig. 2. Kationen-Massenspektrum von 3-O-Acetyladiagenin (7) (Präp. STH 4), Smp. 189-193°¹⁸⁾

Versuchsweise Zuordnung:

$M = 516$	354 = $M-102-60$
456 = $M-60$ (Essigsäure)	336 = $M-102-60-18$
432 = $M-84$ (C_5H_8O = Isopropylketen)	321 = 336-15 (Methyl)
414 = $M-102$ ($C_8H_{10}O_2$ = Isovaleriansäure)	263 = $C_{17}H_{27}O_2$ (9)
396 = $M-102-18$ (H_2O)	228 = $C_{17}H_{24}$ (10)
372 = $M-102-42$ (Keten) und $M-84-60$	203 = $C_{15}H_{23}$ (11)

¹⁸⁾ Wir danken Herrn Dr. H. HÜRZELER, Physikalischer Labor der CIBA A.G., Basel, auch hier bestens für die Aufnahme dieses Spektrums. Es wurde mit einem ATLAS-Massenspektrometer, Modell CH4, ausgerüstet mit Ofenionquelle TO4 und SEV-Aufwäger, aufgenommen.

8. *Biologische Prüfung.* Herr Prof. CHEN hatte die Freundlichkeit, Adigosid an der anästhesierten Katze zu prüfen²⁰). Sein Bericht vom 6. 5. 1965 lautet wie folgt: 'It gives me pleasure to report to you our results on your adigoside. One cat survived 4.912 mg/kg; another 11.287. The animal receiving the larger dose vomited when 5.648 mg/kg had been injected, and showed afterwards nodal rhythm, ventricular premature beats, and bundle-branch-block. These changes occur with active glycosides but in this case they did not become more serious to cause death. Had we had more material, we might have run more experiments with larger doses. Judging from the results of these two animals, we conclude that adigoside has a very weak, if any, cardiotoxic action.

Realizing the novel structure of this glycoside, my Japanese colleague, Dr. KEN ITO, my assistant Mr. TERRY DAVIS, and I worked together for one whole day so

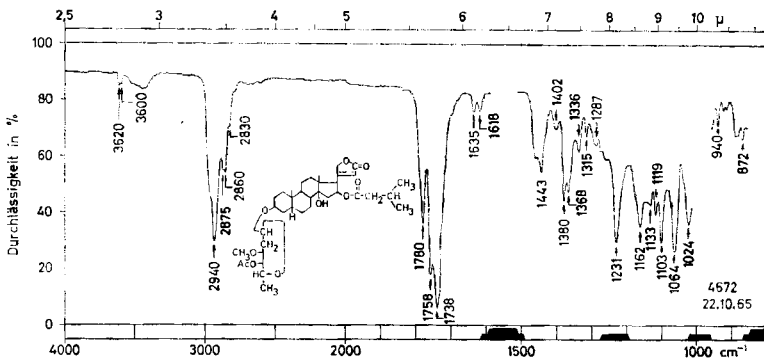


Fig. 3. IR-Absorptionsspektrum von *O*-Acetyl-adigosid (3) (Präp. STH 2), Smp. 121–124°
0,0095 M in CCl₄, *d* = 1,0 mm²¹).

Die schwache Bande bei 3,53 μ dürfte der Methoxygruppe im Zucker entsprechen. Vgl. [35]

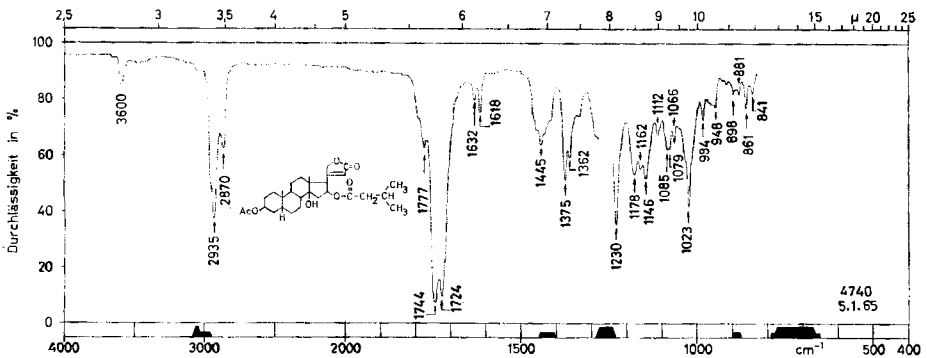


Fig. 4. IR-Absorptionsspektrum von 3-*O*-Acetyl-adigenin (7) (Präp. STH 4), Smp. 189–193°
0,045 M in CH₂Cl₂, *d* = 0,2 mm²¹)

²⁰) Wir danken Herrn Prof. K. K. CHEN, Indiana University, Indianapolis, USA, und seinen Mitarbeitern auch hier bestens für die Mühe und die Überlassung der Resultate. Methodik vgl. [25].

²¹) Aufgenommen von den Herren CH. SENN, W. SCHWAB und Dr. U. HEIDRICH auf einem PERKIN-ELMER-Zweistrahlgitter-Spektrophotometer, Modell 125.

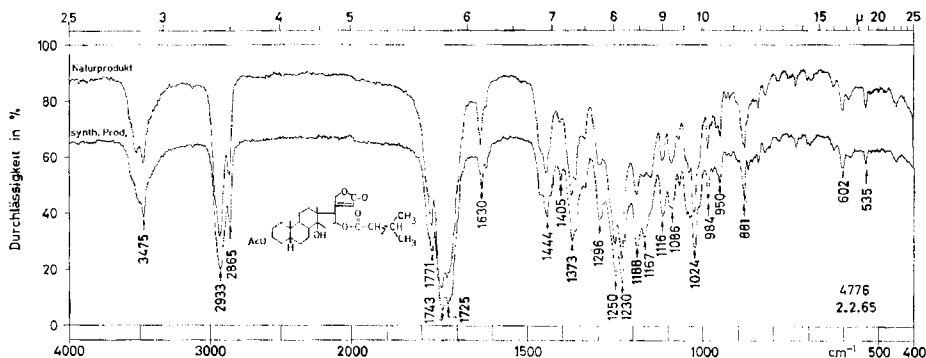


Fig. 5. IR-Absorptionsspektren von 3-O-Acetyl-adigenin (7).

Obere Kurve = Präp. STH 4 (aus Adigosid, Smp. 189–193°, ca. 0,9 mg fest in ca. 300 mg KBr²¹).
 Untere Kurve (20% nach unten verschoben) = Präp. STH 6 (durch Teilsynthese aus 5 bereitet),
 Smp. 194–198°, ca. 0,8 mg fest in ca. 300 mg KBr²¹)

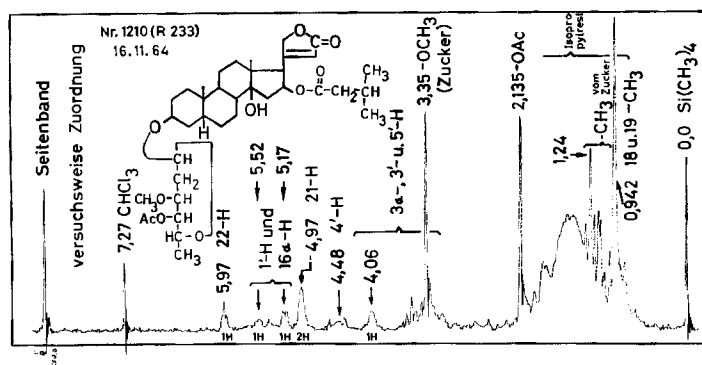


Fig. 6. Protonenresonanzspektrum von O-Acetyl-adigosid (3) (Präp. STH 2), Smp. 121–124°, $C_{37}H_{56}O_{10}$ (660,82), aufgenommen in $CDCl_3$ bei 60 MHz²²)

that there was no mishap in the procedures and no misinterpretation of our results. It was absolutely positive that the ether anesthesia was uniform and the amount of ethanol was harmless. I am therefore confident of this report.'

Das Resultat ist unerwartet, denn das analog gebaute Oleandrin (12) (Oleandrin- α -L-oleandrosid) besitzt nach CHEN eine relativ hohe Toxizität: geometrisches Mittel der letalen Dosis (MLD) 0,1971 mg/kg (Katze) [26]. Adigosid (2) unterscheidet sich chemisch vom Oleandrin (12) aber lediglich durch Isomerie im Zuckerteil sowie durch Ersatz der 16-ständigen Acetyl- durch eine Isovaleryl-Gruppe. Es ist ferner bekannt, dass der Austausch des Zuckers L-Oleandrose gegen D-Diginose bei

²²) Wir danken Herrn Dr. R. F. ZÜRCHER, Physiklabor der CIBA A.G., Basel, auch hier bestens für die Aufnahme und Interpretation dieser Spektren. Für das Spektrum Fig. 6 diente ein VARIAN-Spektrograph, Modell DP-60, für das Spektrum Fig. 7 diente ein VARIAN-Spektrograph, Modell HA-100. Als interne Bezugssubstanz diente Tetramethylsilan, das zugleich Nullpunkt der ppm-Skala ist. Signale bei kleiner Feldstärke werden positiv gezählt. Weitere Angaben siehe bei ZÜRCHER [36].

Cardenoliden ohne grossen Einfluss auf die Wirksamkeit ist²³⁾. Die bestenfalls sehr niedrige Toxizität des Adigosid zeigt daher, dass der Ersatz der Acetoxygruppe in 16-Stellung durch eine Isovaleryloxygruppe die Toxizität für die Katze praktisch völlig vernichtet.

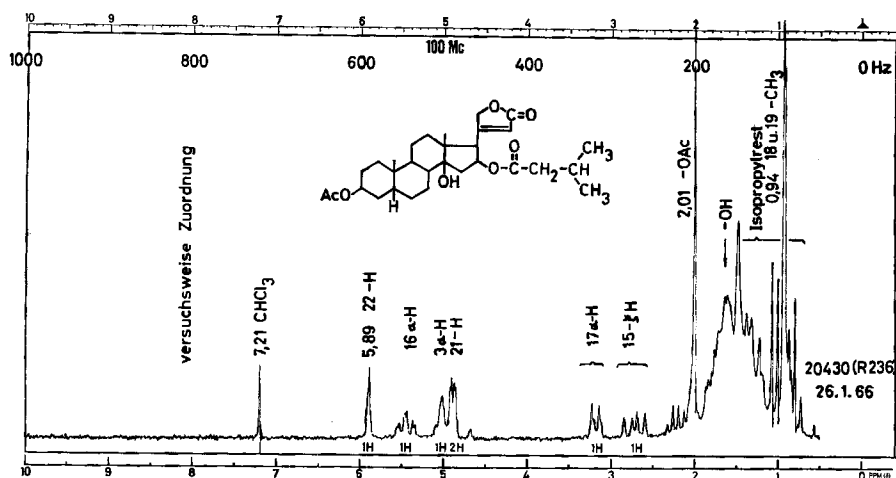


Fig. 7. Protonenresonanzspektrum von 3-O-Acetyl-adigenin (7) (Präp. STH 4), Smp. 189–193°, $C_{30}H_{44}O_7$ (516,65), aufgenommen in $CDCl_3$ bei 100 MHz²²⁾

Zur Beschaffung des Pflanzenmaterials standen uns Mittel aus den Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes (BUNDESAMT FÜR INDUSTRIE, GEWERBE UND ARBEIT in Bern) zur Verfügung. Einen Beitrag an die weiteren Kosten dieser Arbeit erhielten wir vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG. Wir möchten auch hier bestens für diese Hilfe danken.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis 200° ca. $\pm 2^\circ$, darüber $\pm 3^\circ$. Substanzproben für optische Messungen wurden 1 Std. bei 60° und 0,02 Torr getrocknet. Zur Adsorptionschromatographie nach DUNCAN [13] diente Kieselgel «MERCK» (Korngrösse 0,05–0,20 mm), für Dünnschichtchromatographie (Dchr.) Kieselgel G nach STAHL [14]. Wo nichts anderes angegeben, wurde bei der Dchr. durch Bespritzen mit 20-proz. *p*-Toluolsulfonsäure in Alk und anschliessendes Erhitzen auf 110° entwickelt. Ausführung der Papierchromatographie (Pchr.) von Steroiden [37] und Desoxyzuckern [38] nach früheren Angaben.

Es wurden die folgenden Abkürzungen benützt: Ac_2O = Acetanhydrid, Ae = Äther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Be = Benzol, Bu = *n*-Butanol, Chf = Chloroform, Cy = Cyclohexan, Eg = Äthylacetat, Fmd = Formamid, Fr. = Fraktion, iPr = Isopropanol, Mc = Methanol, Mek = Butanon, Pe = Petroläther, Pgl = Propylenglykol, Pn = Pentan, Py = Pyridin, To = Toluol, W = Wasser.

Extraktion der Samen (ausgeführt am 10. 5. 1964). 1,3 kg Samen, die noch etwas Flughaare enthielten, wurden in einer Schlagmühle fein gemahlen. Das Pulver wurde 6mal mit je 7,5 l Pe bei 30–35° unter gelegentlichem Rühren 30 Min. stehengelassen und jeweils abgenutscht. Das

²³⁾ Vom Oleandrigenin- β -D-diginosid (= Nerigosid) ist leider die biologische Wirkung nicht bestimmt worden. Dagegen wurden die entsprechenden Glykoside mit Digitoxigenin geprüft und zeigten annähernd gleiche Wirksamkeit. Digitoxigenin- β -D-diginosid (= Odorosid A) zeigte eine MLD von 0,1859 mg/kg [27]. Digitoxigenin- α -L-oleandrosid (= Beaumontosid) zeigte eine MLD von 0,1734 mg/kg [28].

entfettete Pulver trocknete man 16 Std. bei ca. 50°. Die vereinigten Pe-Lösungen gaben beim Eindampfen 125 g (9,2%) braungelbes Öl (nicht untersucht).

Zur Fermentierung [39] wurde das trockene Samenpulver mit 8 l W angeteigt, mit 400 ml Chf und 30 ml To vermischt und 14 Tage bei 25° unter gelegentlichem Rühren stehengelassen, danach scharf abgenutscht und zweimal mit wenig W gewaschen. Die Filtrate wurden bei 0° aufbewahrt. Das feuchte Samenpulver wurde mit 10 l 50-proz. Alk 30 Min. unter gelegentlichem Umschwenken auf 55–60° erwärmt, dann durch eine ca. 1 cm dicke Schicht Kieselgur (vorher mit 50-proz. Alk ausgekocht) abgenutscht und mit 50-proz. Alk nachgewaschen. Das verbliebene Samenpulver wurde nochmals gleich behandelt, dann mit 10 l 70-proz. Alk und anschliessend noch 3mal mit je 10 l 96-proz. Alk in gleicher Weise extrahiert. Der letzte Extrakt gab mit KEDDE-Reagens [3] keine Färbung mehr. Der Wasserauszug und die 6 alkoholischen Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum auf ca. 1,5 l eingengt. Die Suspension wurde unter Schütteln langsam mit 5 l 96-proz. Alk versetzt, wobei ein Niederschlag ausfiel, der abgenutscht und mit Alk nachgewaschen wurde. Das klare Filtrat wurde im Vakuum auf ca. 1 l eingengt und 5mal mit je 1 l Ac, dann noch 5mal mit je 1 l Chf ausgeschüttelt. Diese Auszüge wurden der Reihe nach 2mal mit 150 ml W, einmal mit 150 ml kalter 2N Sodalösung und 2mal mit 150 ml halbgesättigter Na₂SO₄-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten 36,5 g roher Ae-Extrakt (noch fetthaltig) und 9,1 g Chf-Extrakt. Die wässrigen Phasen wurden verworfen.

Entfettung des rohen Ae-Extraktes [40]. Die 36,5 g Material wurden in 500 ml 80-proz. Me gelöst und mit 500 ml Pe ausgeschüttelt. Die methanolisch-wässrige Phase wurde noch 2mal mit je 400 ml Pe ausgeschüttelt und die Pe-Auszüge noch 2mal im Gegenstrom mit je 400 ml 80-proz. Me ausgeschüttelt. Die Pe-Lösungen gaben nach Trocknen und Eindampfen noch 20 g dunkelbraunes Öl; KEDDE-Reaktion negativ; verworfen.

Die methanolisch-wässrigen Phasen wurden vereinigt, im Vakuum vom Me befreit und die verbliebene wässrige Suspension 3mal mit 500 ml Chf ausgeschüttelt. Die gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen im Vakuum 16,2 g gereinigten Ae-Extrakt. Resultat der Prüfung im Pchr. vgl. Tabelle 1.

Erste Chromatographie. Für die erste Anreicherung diente eine Säule aus 1 kg Kieselgel «МЕРСК» (Korngrösse 0,05–0,20 mm). Resultat vgl. Tabelle 3.

Tabelle 3. *Chromatographie von 16,2 g gereinigtem Ae-Extrakt an 1 kg SiO₂*

Fr.-Nr.	Lösungsmittel 500 ml je Fr.	Eindampfrückstand		
		Menge in mg	KEDDE-Reaktion bzw. Flecke im Pchr.	Weitere Verarbeitung
1–4	Chf	66,4	negativ	verworfen
5–9	Chf-Me-(99:1)	20,6	negativ	
10	Chf-Me-(98:2)	8,3	negativ	verworfen
11	Chf-Me-(98:2)	2,0	negativ	verworfen
12a	Chf-Me-(98:2)	345,2	negativ	verworfen
12b	Chf-Me-(98:2)	303,1	α , A, (β), (B), (γ), (δ)	nicht getrennt
13	Chf-Me-(98:2)	311,1	(α), A, β , B, γ , C, D	zur Chromat. Tabelle 4; 2,359 g
14	Chf-Me-(98:2)	400,7	(A), β , B, γ , C, D	
15	Chf-Me-(98:2)	410,2	(A), (β), B, γ , C, δ , D	
16	Chf-Me-(98:2)	236,1	(β), B, γ , C, D, (E)	
17	Chf-Me-(98:2)	284,6	B, γ , C, δ , D, E, (F)	
18	Chf-Me-(98:2)	716,7	B, γ , C, D, E, F	
19	Chf-Me-(98:2)	1333,3	((B)), γ , C, D, E, F	nicht getrennt
20	Chf-Me-(98:2)	1603,4	frei von B	nicht getrennt
21	Chf-Me-(98:2)	1182,7	frei von B	nicht getrennt
22	Chf-Me-(98:2)	803,1	frei von B	nicht getrennt
23	Chf-Me-(98:2)	584,5	frei von B	nicht getrennt
Rest	Chf-Me-(1:1)	5768,8	frei von B	nicht getrennt

Total 14380 = 89%

Tabelle 4. *Chromatographie von 2,359 g Gemisch (Fr. 13–18 von Tab. 3) an 1,9 kg SiO₂ nach DUNCAN*

Fr.-Nr.	Lösungsmittel 120 ml je Fr.	Menge in mg	Eindampfrückstand	
			KEDDE-Reaktion bzw. Flecke im Dchr. oder Pchr.	Weitere Verarbeitung
1–28	Cy-iPr-(4:1)	—	—	—
29–45	Cy-iPr-(4:1)	101,1	negativ	verworfen
46–49	Cy-iPr-(4:1)	22,8	schwach positiv	nicht getrennt
50–60	Cy-iPr-(4:1)	79,0	positiv	nicht getrennt
61–70	Cy-iPr-(4:1)	82,9	γ	Endprodukt
71–74	Cy-iPr-(4:1)	47,5	γ , β , (A)	nicht getrennt
75–79	Cy-iPr-(4:1)	38,7	γ , β , A	nicht getrennt
80	Cy-iPr-(4:1)	10,7	γ , β , A, α , (E)	nicht getrennt
81–84	Cy-iPr-(4:1)	95,1	(β), (A), E, C	nicht getrennt
85–90	Cy-iPr-(4:1)	146,5	(β), E, C	nicht getrennt
91–94	Cy-iPr-(4:1)	200,3	B, ((E)), C	} zur Verteilungschromat. Tabelle 5; 709 mg
95–100	Cy-iPr-(4:1)	235,4	B, (E), C	
101–105	Cy-iPr-(4:1)	82,4	B, (E), C	
106–110	Cy-iPr-(4:1)	67,5	B, (E), C	
111–115	Cy-iPr-(4:1)	52,3	B, (E), C	
116–120	Cy-iPr-(4:1)	38,4	B, E, C, Pigment	
121–125	Cy-iPr-(4:1)	32,8	B, E, C	
126–130	Cy-iPr-(4:1)	122,2	E, (C), (δ), (D)	nicht getrennt
131–135	Cy-iPr-(4:1)	158,8	E, (C), (δ), (D)	nicht getrennt
136–140	Cy-iPr-(4:1)	70,9	E, (C), (δ), D	nicht getrennt
141–145	Cy-iPr-(4:1)	40,9	E, D	nicht getrennt
146–149	Cy-iPr-(4:1)	5,9	E, D	nicht getrennt
Rest	Cy-Me-(1:1)	392,7	(E), D, F	nicht getrennt
Total 2124,8 = 90,5%				

Zweite Chromatographie. Die Fr. 13–18 von Tabelle 3 wurden vereinigt (2,359 g), in wenig Chf gelöst, mit 10 g Kieselgel gut vermischt, im Vakuum getrocknet und auf die Säule gebracht. Diese wurde aus 1,9 kg SiO₂ nach DUNCAN [13] bereitet. Über das Resultat orientiert Tabelle 4.

Dritte Chromatographie (Verteilungschromatographie) [37b]. 1 kg Cellulose (HR-L 600, bezogen von der Firma MIKROTECHNIK, Miltenberg, Deutschland) wurde nacheinander mit je 4 l Chf, Me, Chf und An bei 30° gewaschen und abgenutzt, dann 16 Std. bei 50–60° getrocknet. Das trockene Pulver (920 g) wurde mit 295 ml (= 35%) Fmd und soviel An vermischt, dass ein dünner Brei entstand. Es wurde 30 Min. auf der Maschine geschüttelt und anschliessend bei 12 Torr und 50° getrocknet. Die so imprägnierte Cellulose wurde in Be-Cy-(1:1) (gesättigt mit Fmd) aufgeschwemmt, gründlich homogenisiert und in die mit demselben Lösungsmittel gefüllte Säule eingestopft.

Die 709 mg Material (Fr. 91–125 von Tab. 4) wurden in wenig Chf gelöst, mit 5 g imprägnierter Cellulose vermischt, im Vakuum bei 20° getrocknet und dann in Be-Cy-(1:1) auf die Säule gepresst, worauf sofort mit der Chromatographie begonnen wurde. Das Eluiermittel wurde zu $\frac{3}{4}$ mit Fmd gesättigt. Jede fünfte der in Tabelle 5 genannten Fr. wurde im Pchr. untersucht. Fraktionen gleicher Zusammensetzung wurden vereinigt, im Vakuum bei 45° auf 5–10 ml eingeeengt, mit 15 ml Chf aufgenommen und zur Entfernung des Fmd mit 20 ml 10-proz. KHCO₃-Lösung und 3mal mit je 20 ml W gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden noch 3mal im Gegenstrom mit je 15 ml Chf ausgeschüttelt. Die vereinigten Chf-Auszüge wurden über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Über das Resultat orientiert Tabelle 5.

Die Fr. 115–139 gaben aus An-Ae 49,6 mg reines Adigosid, Smp. 141–145°/158°. Die eingeeengte Mutterlauge (137,5 mg) wurde mit den Fr. 140–173 vereinigt und das Ganze (361,2 mg) nochmals nach DUNCAN chromatographiert; vgl. Tabelle 6.

Tabelle 5. Verteilungschromatographie von 709 mg Gemisch (Fr. 91–125 von Tab. 4)

Fr.-Nr.	Lösungsmittel 60 ml je Fr.	Eindampfrückstand		Weitere Verarbeitung
		Menge in mg	Flecke im Pchr.	
1–25	Be-Cy-(1:1)	—	—	—
26–89	Be-Cy-(1:1)	50,3	(α), (A), (β), (Pigment)	nicht getrennt
90–98	Be-Cy-(1:1)	5,1	(A), (β), ((B)), Pigment	nicht getrennt
99–106	Be-Cy-(1:1)	5,7	(A), (β), ((B)), Pigment	nicht getrennt
107–114	Be-Cy-(1:1)	13,0	(β), (B), ((C))	nicht getrennt
115–122	Be-Cy-(1:1)	26,2	B, ((C))	} Aus An-Ae 49,6 mg krist. B, Smp. 141–145°/ 158°. ML (137,5 mg) zur Chromat., Tab. 6
123–131	Be-Cy-(1:1)	65,2	B, (C)	
132–139	Be-Cy-(1:1)	95,7	B, (C)	
140–148	Be-Cy-(1:1)	101,0	B, (C)	} zur Chromat., Tab. 6; 223,9 mg
149–156	Be-Cy-(1:1)	56,9	B, (C)	
157–173	Be-Cy-(1:1)	66,0	B, C	
174–190	Be-Cy-(1:1)	42,9	B, C, ((E))	nicht getrennt
191–199	Be-Cy-(1:1)	21,2	(B), C, (E)	nicht getrennt
200–207	Be-Cy-(1:1)	17,8	((B)), C, E	nicht getrennt
Rest	Be-Chf-(1:1)	60,3	C, E	nicht getrennt
		Total 627,3 = 88%		

Tabelle 6. Chromatographie von 361,2 mg Gemisch aus Fr. 115–173 von Tabelle 5 an 340 g SiO₂ nach DUNCAN

Fr.-Nr.	Lösungsmittel 25 ml je Fr.	Eindampfrückstand		Weitere Verarbeitung
		Menge in mg	Flecke im Dchr.	
1–34	Chf-iPr-(96:4)	—	—	—
35–40	Chf-iPr-(96:4)	217,5	B	Endprodukt
41–42	Chf-iPr-(96:4)	43,2	B, ((C))	} zur präp. Dchr. 104,8 mg
43–44	Chf-iPr-(96:4)	43,7	B, (C)	
45	Chf-iPr-(96:4)	17,9	B, C	
46	Chf-iPr-(96:4)	8,7	B, C	nicht getrennt
47–48	Chf-iPr-(96:4)	10,6	(B), C	nicht getrennt
49–57	Chf-iPr-(96:4)	13,3	((B)), C	nicht getrennt
		Total 355,0 = 98,5%		

Präparative Dünnschichtchromatographie von 104,8 mg Gemisch (Fr. 41–45 von Tab. 6). 150 g Kieselgel G und 20 mg 3,5-Dihydroxy-pyren-8,10-disulfonsaures Natrium als Fluoreszenzindikator [16]¹⁵⁾ wurden mit 300 ml Me-W-(1:1) gut vermischt. 5 Glasplatten (20 × 20 cm) wurden mit diesem Brei gleichmässig bestrichen [14] [15] und 1 Std. bei ca. 100° aktiviert. Auf jeder Platte befanden sich dann ca. 15 g trockenes SiO₂. Ca. 20 mg Substanz wurden auf der Startlinie aufgetragen und aufsteigend im System Chf-iPr-(95:5) chromatographiert. Wenn die Front den oberen Rand nahezu erreicht hatte, wurde getrocknet und ein zweites Mal genau gleich chromatographiert. Auf den erneut getrockneten Platten wurden die im UV.-Licht gut sichtbaren Zonen herausgekratzt und mit Chf-Me-(9:1) eluiert. Erhalten wurden 76,4 mg rohes Adigosid und 19,7 mg rohes C; letzteres wurde nicht weiter gereinigt. Das rohe Adigosid, das noch etwas Fluoreszenzindikator enthielt, wurde zur Reinigung an 74 g SiO₂ nach DUNCAN chromatographiert; Fließ-

mittel Chf-iPr-(95:5). Die Fr. 29–32 lieferten reines Adigosid (52,6 mg). Die Fr. 28 (14,4 mg) enthielt auch schon vorwiegend Adigosid, daneben eine nicht identifizierte Verunreinigung.

Adigosid (2) (B; Präp. STH 1). Aus An-Ac farblose, zu Drusen vereinigte feine Nadeln mit Doppel-Smp. 141–145°/158°; $[\alpha]_D^{25} = -20,8 \pm 2^\circ$ ($c = 1$ in Me). Nach Smp., Mischprobe, Drehung und Laufstrecken im Pchr. sowie Dchr. (Systeme: Be/Fmd, Be-Cy-(1:1)/Fmd, Be-Cy-(3:2)/Pgl, Cy-iPr-(7:3)) identisch mit früher beschriebenen Analysenpräparat [2]. Farbreaktionen und Spektren vgl. Theoret. Teil dieser sowie der früheren Arbeit [2].

$C_{35}H_{54}O_9$ (618,78) Ber. C 67,93 H 8,80% Früher Gef. C 67,86 H 9,00% [2]

4'-O-Acetyl-adigosid (3) (Präp. STH 2). 27 mg krist. Adigosid vom Smp. 141–145°/158° wurden in 0,8 ml abs. Py und 0,65 ml Ac_2O 36 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 15 ml Chf-Ae-(1:3) aufgenommen, je zweimal mit 4 ml 2N HCl, 10-proz. $KHCO_3$ -Lösung und W gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt (leicht gelblicher Schaum) war nach Pchr. (Be-Cy-(1:1)/Fmd) und nach Dchr. (Cy-iPr-(4:1)) nicht ganz rein und wurde an 18 g SiO_2 chromatographiert. Man erhielt 22,9 mg reine Eluate. Diese gaben aus Ae-Pn 19,2 mg farblose, zu Drusen vereinigte feine Nadeln, Smp. 121–124°, $[\alpha]_D^{25} = -18,0 \pm 2^\circ$ ($c = 1,06$ in Me). IR.-Spektrum vgl. Fig. 3, NMR.-Spektrum Fig. 6. Zur Analyse wurde 5 Std. bei 0,01 Torr und 80° über P_2O_5 getrocknet: Gewichtsverlust 0,99%.

$C_{37}H_{56}O_{10}$ (660,82) Ber. C 67,25 H 8,54% Gef. C 66,82 H 8,61%

Abspaltung von Isovaleriansäure aus Adigosid an Al_2O_3 . 4,0 mg krist. Adigosid (2) wurden in wenig alkoholfreiem Chf (frisch durch Al_2O_3 Akt. I filtriert [41]) gelöst, auf eine trockene Säule von 3 g Al_2O_3 («WOELM neutral», Akt. I) gegeben und 48 Std. verschlossen im Dunkeln stehengelassen. Dann wurde mit Chf-Me-(1:1) cluiert. Der erhaltene farblose Schaum (3,8 mg) zeigte im Pchr. (Be-Chf-(9:1)/Fmd) neben dem Fleck des Ausgangsmaterials einen zweiten, wenig langsamer laufenden Fleck von gleicher Laufstrecke wie 16-Anhydro-desacetyl-nerigosid (4). Das Rohprodukt gab im UV.-Absorptionsspektrum ein Maximum bei 270 nm ($\log \epsilon = 3,65$ ber. auf 534,7); dies würde einer Mischung von ca. 78% 2 und ca. 22% 4 entsprechen.

Milde alkalische Verseifung von Adigosid mit $KHCO_3$ [19]. 2 mg krist. Adigosid (2) wurden in 0,5 ml Me gelöst, mit 0,2 ml einer Lösung von 50 mg $KHCO_3$ in 1 ml W vermischt und 5 Tage bei 20° stehengelassen. Dann wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 5 ml Chf aufgenommen, zweimal mit 5 ml W gewaschen, die wässerigen Phasen dreimal mit 5 ml Chf nachgewaschen, die vereinigten Chf-Auszüge über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Man erhielt 1,6 mg farblosen Schaum, der im Pchr. (System Be-Chf-(7:5)/Fmd) geprüft wurde. Adigosid war nur noch in Spuren nachweisbar; dafür trat ein neuer, viel langsamer laufender Fleck auf, der dieselbe Laufstrecke hatte wie 16-Desacetyl-nerigosid (1).

Milde saure Hydrolyse von Adigosid [20]. 194,2 mg krist. Adigosid (2) wurden in 25 ml Me gelöst, mit 25 ml 0,1N H_2SO_4 versetzt und 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde mit 25 ml W verdünnt, das Me im Vakuum bei 30° Badtemperatur unter Schütteln entfernt und der amorphe Niederschlag nach halbstündigem Stehen bei 0° abgenutscht, mehrmals mit kleinen Mengen W gewaschen und im Vakuum über KOH getrocknet. Es verblieben 132,1 mg rohes Genin. Das Filtrat und die Waschwasser wurden zur Spaltung von Methylglykosiden noch 1 Std. auf 60° erwärmt, anschließend abgekühlt und dreimal mit je 15 ml Chf ausgeschüttelt. Die mit wenig W, 10-proz. $KHCO_3$ -Lösung und W gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge hinterliessen noch 18,4 mg Genin; Ausbeute total 150,5 mg.

Die saure wässrige Phase und das erste Waschwasser wurden im Vakuum von Chf-Resten befreit, mit reinem, frisch aus $Ba(OH)_2$ mit CO_2 gefällt und mit heissem W gewaschenem $BaCO_3$ heiss neutralisiert und durch ein mit $BaCO_3$ gedichtetes Filter genutscht. Das leicht trübe Filtrat wurde mit ca. 10 mg frischem $BaCO_3$ versetzt und im Vakuum vollständig eingedampft. Der trockene Rückstand wurde in wenig An aufgenommen, mit abs. Ae versetzt, filtriert und mit An-Ae nachgewaschen. Die klare Lösung wurde mit 1 mg $BaCO_3$ versetzt, im Molekularkolben eingedampft und der Rückstand bei 0,01 Torr und 100° Badtemperatur destilliert. Das farblose Destillat (32,5 mg) gab aus Ac-Pn 19,2 mg farblose Kristalle, Smp. 80–84°, $[\alpha]_D^{25} = +59,2 \pm 2^\circ$ ($c = 1,4$ in W). Nach Mischprobe und Laufstrecke im Pchr. (Systeme: To-Mck-(1:1)/W und To-Bu-(4:1)/W, nach RENKONEN & SCHINDLER [38]) identisch mit authentischer D-Diginose (8).

Adigenin (6) (Präp. STH 3). Das rohe Genin war nach Pchr. (System: Be-Cy-(1:1)/Fmd) nicht ganz einheitlich. Neben **6** enthielt es etwas 16-Anhydro-gitoxigenin. Es wurde daher an 160 g SiO₂ nach DUNCAN chromatographiert; Eluiermittel Cy-iPr-(4:1). Erhalten wurden 110,5 mg reines Material als farbloses Harz, $[\alpha]_D^{24} = -7,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,14$ in Me), $\lambda_{\max} = 215$ nm ($\log \epsilon = 4,13$ ber. auf 474).

3-O-Acetyl-adigenin (7) (Präp. STH 4). 25,6 mg reines, amorphes Adigenin (**6**) wurden in 0,6 ml abs. Py und 0,48 ml Ac₂O 36 Std. bei 20° stehengelassen. Aufarbeitung wie bei **3** gab 27,8 mg neutrales Rohprodukt, das nach Pchr. (System: Be-Cy-(1:3)/Fmd) und Dchr. (Cy-iPr-(4:1)) einheitlich war. Aus Ac-Pn wurden 18,6 mg farblose Stäbchen erhalten, Smp. 189–193°, $[\alpha]_D^{25} = -12,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,02$ in Chf). IR.-Spektren (Fig. 4 und 5), NMR.-Spektrum (Fig. 7) und Massenspektrum (Fig. 2). Trocknung zur Analyse 5 Std. bei 0,01 Torr und 80° über P₂O₅; Gewichtsverlust 0,35%.

C₃₀H₄₄O₇ (516,65) Ber. C 69,74 H 8,58% Gef. C 69,92 H 8,68%

Isovaleriansäure-anilid aus Adigenin (6). 45 mg reines Adigenin (amorph) in 0,5 ml frisch dest. Anilin wurden 2 Std. unter Rückfluss gekocht (Badtemperatur 210°). Nach Erkalten wurde das Reaktionsprodukt in 15 ml Ae gelöst und je dreimal mit je 5 ml 2N HCl, 2N NaOH und W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Das neutrale Produkt (39 mg) zeigte im Dchr. (System: Cy-iPr-(9:1), entwickelt mit Ce^{IV}-Sulfat-Schwefelsäure [14]) neben Isovaleriansäureanilid 5 weitere Flecke (Zersetzungsprodukte des Genin-Anteils usw.). Chromatographie an 40 g SiO₂ (Eluiermittel: Cy-iPr-(9:1)) lieferte 6,2 mg leicht gelbliches Anilid. Sublimation bei 0,02 Torr und 65–70° sowie Kristallisation aus Pn gab 2,7 mg farblose Nadeln, Smp. 112–114°. Nach Mischprobe, Dchr. (System: Cy-iPr-(9:1)) und IR.-Spektrum identisch mit authentischem Vergleichsmaterial.

3-O-Acetyl-gitoxigenin (5) [29] [30]. 1,1 g Di-O-acetyl-gitoxigenin [42] [21] vom Smp. 250–251° wurden in 250 ml Me gelöst, mit einer Lösung von 300 mg K₂CO₃ in 10 ml W versetzt und 14 Std. auf der Maschine bei 20° geschüttelt. Hierauf wurde mit HCl neutralisiert, das Me im Vakuum entfernt und dreimal mit 60 ml Chf ausgeschüttelt. Die mit W gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge hinterliessen 1 g neutrales Rohprodukt, das nach Dchr. (System: Eg) neben **5** noch Ausgangsmaterial, sowie Gitoxigenin enthielt. Es wurde an 700 g SiO₂ (Eluiermittel: Eg) chromatographiert. Es resultierten 197,5 mg reines **5**, aus An-Ac 135 mg farblose Stäbchen, Smp. 218–224°. Weitere Fraktionen gaben noch 251,5 mg nicht ganz reines **5**.

3-O-Acetyl-adigenin (7) teilsynthetisch (Präp. STH 6). 56,5 mg 3-O-Acetyl-gitoxigenin vom Smp. 218–224° wurden in 1,3 ml abs. Py gelöst, unter H₂O-Ausschluss bei 0° tropfenweise mit 0,45 ml käuflichem, frisch dest. Isovaleriansäurechlorid versetzt und 3 Std. bei 0°, sowie 12 Std. bei 20° stehengelassen. Anschliessend wurde mit 0,45 ml Me versetzt und noch 2 Std. stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung mit Chf-Ac-(1:3) gab 222,3 mg neutrales Rohprodukt, das nach Dchr. (System: Cy-iPr-(4:1)) neben **7** vorwiegend stark polare Verunreinigungen enthielt (vermutlich aus dem nicht ganz reinen Isovaleriansäurechlorid stammend). Es wurde an 250 g SiO₂ chromatographiert (Eluiermittel: Cy-iPr-(4:1)). Dabei resultierten 59,8 mg Rohprodukt, das nur noch den Fleck von **7** zeigte. Kristallisation aus Ae-Pn gab zunächst farblose Nadeln vom Smp. 173–176°. Nach erneutem Kristallisieren und Animpfen mit einer Spur Präp. STH 4 wurden 18,5 mg farblose Stäbchen erhalten, Smp. 194–198°, $[\alpha]_D^{24} = -12,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,22$ in Chf). Nach Mischprobe, Dchr. (System: Cy-iPr-(4:1)), Drehung und IR.-Spektrum (vgl. Fig. 5) identisch mit dem aus Adigosid erhaltenen Präp. STH 4.

Teilsynthese des n-Valeriansäure-Derivates. 52,6 mg 3-O-Acetyl-gitoxigenin vom Smp. 218–224° wurden in 1,2 ml abs. Py gelöst, mit 0,41 ml käuflichem, frisch dest. n-Valeriansäurechlorid in gleicher Weise wie oben umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt 538,6 mg neutrales Rohprodukt, das nach Dchr. (System: Cy-iPr-(4:1)) ebenfalls polare Verunreinigungen enthielt, die durch eine SiO₂-Chromatographie an 300 g SiO₂ (Eluiermittel: Cy-iPr-(4:1)) abgetrennt wurden. Man erhielt 48 mg nach Dchr. reines n-Valeriansäure-Derivat, das auch nach Animpfen mit Präp. STH 4 nicht kristallisierte, aber im Pchr. und Dchr. (Systeme: Cy/Dimethyl-Fmd; Me-W-(88:12)/Olivenöl; Cy-iPr-(4:1)) gleiche Laufstrecken zeigte.

Die Mikroanalysen wurden von Herrn E. THOMMEN im Mikrolabor unseres Institutes ausgeführt.

SUMMARY

This publication reports the preparative isolation of adigoside from the seeds of *Nerium oleander* L. with a yield of 250 mg crystalline adigoside per kilogram of seeds. Mild acid hydrolysis of adigoside gave crystalline D-diginose (8) and amorphous adigenin (6), which in turn gave a crystalline mono-O-acetyl derivative 7. With the aid of physical methods, degradative reactions and partial synthesis of 7, the structure of adigenin was proved to be that of 16-O-isovaleryl-gitoxigenin. On the basis of molecular rotation it was shown that the sugar in adigoside (2), in accordance with the KLYNE Rule, is bound in the β -D-pyranosidic form. Adigoside showed no (or at the most very weak) digitalis type activity on the cat. This lack of activity must be due to the esterification of the 16-hydroxyl group by isovaleric acid, as it is known that an acetyl residue in the same position enhances rather than lowers the activity of 16 β -hydroxy-cardenolides.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. BRANDT, H. KAUFMANN & T. REICHSTEIN, *Helv.* 49, 1844 (1966).
- [2] HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 42, 977 (1959).
- [3] D. L. KEDDE, *Pharmac. Weckbl.* 82, 741 (1947); I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.* 52, 643 (1952).
- [4] Ausführung nach J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 883 (1948).
- [5] M. PESEZ, *Ann. pharmac. franç.* 10, 104 (1952), und frühere Lit. daselbst.
- [6] A. PETIT, M. PESEZ, P. BELLET & G. AMIARD, *Bull. Soc. chim. France* [5] 17, 288 (1950); P. BELLET, *Ann. pharmac. franç.* 8, 471 (1950); Ausführung mit SbCl₃ auf Papier vgl. H. JÄGER *et al.* [2] und frühere Lit. daselbst.
- [7] R. BERTHOLD, W. WEHRLI & T. REICHSTEIN, *Helv.* 48, 1634 (1965); vgl. auch A. F. KRASSO, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.* 39, 168 (1964).
- [8] R. BRANDT, W. STÖCKLIN & T. REICHSTEIN, *Helv.* 49, 1662 (1966).
- [9] R. TSCHESCHE & R. PETERSEN, *Chem. Ber.* 86, 574 (1953).
- [10] H. HEGEDÜS & T. REICHSTEIN, *Helv.* 38, 1133 (1955).
- [11] P. ST. JANIÄK, *Diss. Universität Basel* 1962; vgl. auch P. ST. JANIÄK, EK. WEISS, J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 46, 374 (1963).
- [12] J. v. EUW, H. HESS, P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 1821 (1951).
- [13] G. R. DUNCAN, *J. Chromatogr.* 8, 37 (1962).
- [14] E. STAHL, «Dünnschicht-Chromatographie», Springer-Verlag, Berlin 1962.
- [15] K. RANDEATH, «Dünnschicht-Chromatographie», Verlag Chemie, Weinheim 1962.
- [16] R. TSCHESCHE, G. BIERNOTH & G. WULFF, *J. Chromatogr.* 72, 342 (1963).
- [17] M. v. ARDENNE, R. TÜMLER, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* 47, 1032 (1964); frühere Lit. daselbst.
- [18] KUNO MEYER, *Helv.* 29, 718 (1946).
- [19] T. REICHSTEIN & J. v. EUW, *Helv.* 27, 1181 (1938).
- [20] S. RANGASWAMI & T. REICHSTEIN, *Helv.* 32, 939 (1949).
- [21] A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 33, 76 (1950).
- [22] G. SPITTELLER, *Z. analyt. Chem.* 197, 1 (1963).
- [23] W. KLYNE, *Biochem. J.* 47, xli (1950).
- [24] CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 1630 (1948).
- [25] K. K. CHEN & F. G. HENDERSON, *Arch. int. Pharmacodyn.* 140, 8 (1962), und frühere Lit. daselbst.
- [26] K. K. CHEN & A. L. CHEN, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 51, 23 (1934).
- [27] K. K. CHEN, F. G. HENDERSON & R. C. ANDERSON, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 103, 420 (1951).

- [28] A. F. KRASSO, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **46**, 1691 (1963).
 [29] M. ZINGG & KUNO MEYER, *Pharmac. Acta Helv.* **32**, 393 (1957).
 [30] M. S. RAGAB, HORST LINDE & KUNO MEYER, *Helv.* **45**, 474 (1962).
 [31] C. W. SHOPPEE & T. REICHSTEIN, *Helv.* **25**, 1611 (1942).
 [32] W. NEUMANN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **70**, 1547 (1937).
 [33] M. v. ARDENNE, *Tabellen zur Angew. Physik*, Bd. I, S. 606, 611, 725 (VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1962).
 [34] M. v. ARDENNE, K. STEINFELDER, R. TÜMMLER & K. SCHREIBER, *Experientia* **19**, 178 (1963); vgl. auch M. v. ARDENNE, *Die Technik* **19**, 673 (1964).
 [35] H. B. HENBEST, G. D. MEAKINS, B. NICHOLLS & A. A. WAGLAND, *J. chem. Soc.* **1957**, 1462.
 [36] R. F. ZÜRCHER, *Helv.* **44**, 1380 (1961); **46**, 2054 (1963).
 [37] a) O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 108 (1951); b) H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 357 (1953); c) F. KAISER, *Chem. Ber.* **88**, 556 (1955).
 [38] O. RENKONEN & O. SCHINDLER, *Helv.* **39**, 1490 (1956).
 [39] J. KRAUS & H. STEIN (C. F. BOEHRINGER G.m.b.H., Mannheim), D.B.P. 880195 (18. 6. 1953).
 [40] O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 1007 (1953).
 [41] G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.* **68**, 752 (1956).
 [42] M. CLOETTA, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **172**, 261 (1926); *Chem. Zbl.* **1962**, II, 771; A. WINDAUS, K. WESTPHAL & G. STEIN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **61**, 1847 (1928).

222. Multiple Formen der Aldolase in Organextrakten der Ratte

Über Aldolasen, 8. Mitteilung¹⁾

von Ph. Christen, U. Rensing²⁾, A. Schmid und F. Leuthardt

(25. VI. 66)

Bisher waren zwei Formen der Aldolase im Säugerorganismus bekannt; das in der Leber vorkommende Enzym unterscheidet sich in seiner enzymatischen Spezifität wesentlich von der Aldolase des Skelettmuskels [2]. Beide Enzyme sind isoliert worden [3]. Es blieb unbekannt, ob die Aldolaseaktivitäten anderer Organe auf das – alleinige oder gemeinsame – Vorkommen dieser beiden bekannten Aldolasen oder auf die Existenz weiterer, unbekannter Aldolasen zurückzuführen sind [4] [5].

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Charakterisierung und Auftrennung der Aldolaseaktivitäten von Organextrakten der Ratte mittels Stärkegelelektrophorese.

Experimentelles. – 1. *Material:* Bezugsquellen: Glycinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, α -Glycero-phosphat-Dehydrogenase, Triose-Isomerase, NAD, NADH, Fructose-1,6-diphosphat, Fructose-1-phosphat (beide als Cyclohexylammoniumsalze): Fa. BOEHRINGER, Mannheim; *p*-Nitroblautetrazoliumchlorid *p. a.*, Phenazin-methosulfat rein: SERVA ENTWICKLUNGS-LABOR, Heidelberg; lösliche Stärke für Gelelektrophorese: CONNAUGHT MEDICAL RESEARCH LABORATORIES, Toronto; Agar-Agar in Federkiefform: Fa. MERCK, Darmstadt.

2. *Versuchstiere:* Männliche, 8–18 Monate alte Albinoratten (*Mus norvegicus albinus*).

3. *Methoden:* 3.1. Die *Proteinkonzentration* und die *Aldolaseaktivität* der Rohextrakte wurden wie in früheren Arbeiten bestimmt [1]. Bei der Aktivitätsbestimmung wurde vor Zugabe des Substrates die spontane Extinktionsabnahme bestimmt und als Nullaktivität von der nach Substratzusatz gemessenen Aktivität abgezogen.

¹⁾ 7. Mitteilung siehe [1].

²⁾ Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft.