

Rückstand wurde in An gelöst, durch wenig Al_2O_3 filtriert und die klare Lösung im Vakuum eingedampft. Der rohe Zuckersirup zeigte im System Bu-Mäk-(1:1)/Borsäure-Borax-Puffer³²⁾ gleiche Laufstrecke wie *Digitalose* (aus Strosposid bereitet).

ZUSAMMENFASSUNG

Die durch Ausschütteln eines aus getrockneten Blättern von *Digitalis canariensis* L., var. *isabelliana* bereiteten wässrigen Auszuges mit Äther und Chloroform gewonnenen Extrakte wurden einer eingehenden Analyse unterzogen. Im Ätherauszug konnten neben den bereits in der vorangegangenen Mitteilung beschriebenen Monosiden a, b und c und den Cardenoliden Digitoxigenin (nicht isoliert) und Uzarigenin die folgenden Substanzen kristallisiert werden: ein gelbes Pigment der Formel $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_3$ (Methyl-methoxy-anthrachinon?), ein Gitoxigenin-Glykosid (= Substanz J), dessen Konstitution nicht abgeklärt werden konnte, und γ -Sitosterin. Letzteres ist damit zum ersten Mal in einer Digitalispflanze nachgewiesen worden. – Aus dem Chloroformextrakt liessen sich die Digitanol-glykoside Digifolein, Diginin und 14 α -Digipronin in Kristallen isolieren, während Lanafolein, das nur in Spuren vorhanden war, sowohl papier- als auch dünn-schicht-chromatographisch nachgewiesen werden konnte. Ausserdem liessen sich zwei für *D. isabelliana* neue digitaloide Glykoside, nämlich Strosposid und in sehr geringer Menge ein vermutlich unbekanntes Digitalosid (= Substanz K) isolieren.

Pharmazeutisches Institut der Universität Basel

³²⁾ M. T. KRAUSS, H. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, J. Chromatogr. 3, 63 (1960).

153. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

43. Mitteilung¹⁾

Zur Kenntnis von Desferrioxamin B

von H. BICKEL, H. KEBERLE und E. VISCHER

(11. V. 63)

Vor einiger Zeit haben wir mit andern Arbeitsgruppen aus Stoffwechselprodukten von Actinomyceten eisenhaltige Verbindungen, die Ferrioxamine, isoliert²⁾. Eingehende Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Produkte zu den Sideraminen, einer grösseren, bisher wenig beachteten Gruppe von Naturstoffen, gehören³⁾.

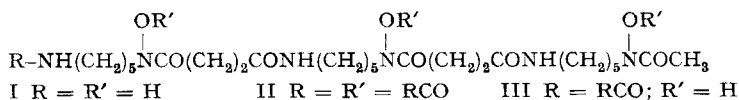
¹⁾ 42. Mitt.: H. GERLACH & V. PRELOG, Liebigs Ann. Chem. 1963, im Druck.

²⁾ H. BICKEL, R. BOSSHARDT, E. GÄUMANN, P. REUSSER, E. VISCHER, W. VOSER, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, Helv. 43, 2118 (1960); W. KELLER-SCHIERLEIN & V. PRELOG, Helv. 45, 590 (1962).

³⁾ H. BICKEL, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, Experientia 16, 129 (1960); H. ZÄHNER, E. BACHMANN, R. HÜTTER & J. NÜESCH, Path. Microbiol. 25, 708 (1962); V. PRELOG, Pure appl. Chemistry 1963, im Druck.

Bei pharmakologischen und klinischen Untersuchungen⁴⁾ mit Verbindungen der Sideraminreihe konzentrierte sich das Interesse vor allem auf die eisenfreie Grundsubstanz des Ferrioxamins B, das Desferri-ferrioxamin B, das wir abgekürzt Desferrioxamin B nannten. Im folgenden werden Herstellung und Eigenschaften dieser Verbindung und einiger ihrer Derivate beschrieben.

Desferrioxamin B entsteht aus Ferrioxamin B⁵⁾ durch Spaltung des Komplexes mit Mineralsäuren oder Alkalien oder durch Entzug des Eisens mit einem Komplexbildner⁶⁾. Wird Ferrioxamin-B-hydrochlorid z.B. mit 8-Hydroxychinolin umgesetzt, so entsteht Desferrioxamin-B-hydrochlorid, das an einem basischen Ionenaustauscher in die freie Base I⁶ übergeführt werden kann.



Desferrioxamin B und seine Salze sind kristalline Verbindungen, die sich in Wasser und niederen Alkoholen oder Gemischen von Wasser und Alkoholen lösen und daraus umkristallisieren lassen. In andern organischen Lösungsmitteln sind sie schlecht oder gar nicht löslich. Das Desferrioxamin-B-methansulfonat⁷⁾ ist besonders gut wasserlöslich. Desferrioxamin B zeigt im sichtbaren Gebiet des Spektrums keine Absorption und im UV. lediglich Endabsorption gegen das kurzwellige Gebiet. In den in Nujol aufgenommenen IR.-Spektren von Desferrioxamin B und seinen Salzen findet man zwischen 6 und 6,5 μ Banden, die auf Amid- und Hydroxamsäure-Gruppen zurückzuführen sind; eine Bande bei 2,96 μ lässt sich ebenfalls den Amidgruppen zuschreiben. Das in D₂O aufgenommene Protonenresonanzspektrum von Desferrioxamin-B-hydrochlorid zeigt u.a. eine typische Signalgruppe bei 3,53 ppm (Tetramethylsilan 0,0 ppm), welche auf die 6 den 3 Hydroxamsäure-Stickstoffatomen benachbarten Protonen zurückzuführen ist.

Desferrioxamin B reagiert in spezifischer Weise mit Fe³⁺-Ionen unter Rückbildung des rotgefärbten Ferrioxamins B⁵⁾⁸⁾. Auf dieser Eigenschaft, die bei der therapeutischen Verwendung ausgenützt wird⁴⁾, beruhen auch einfache Nachweis- und Bestimmungsverfahren⁹⁾. Desferrioxamin B wird beim Erhitzen in verdünnter Mineralsäure zu 3 Mol. 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan, 2 Mol. Bernsteinsäure und 1 Mol.

⁴⁾ Vgl. z. B. J. TRIPOD & H. KEBERLE, *Helv. med. Acta* 29, 674 (1962); J. TRIPOD & H. KEBERLE, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 20, 291 (1962); S. MOESCHLIN *et al.*, *Schweiz. med. Wschr.* 92, 1295 (1962); L. HEILMEYER & F. WÖHLER, *Dtsch. med. Wschr.* 87, 2661 (1962); F. WÖHLER, *Med. Klinik* 57, 1370 (1962).

⁵⁾ H. BICKEL, G. E. HALL, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 43, 2129 (1960); V. PRELOG & A. WALSER, *Helv.* 45, 631 (1962).

⁶⁾ Desferrioxamin B lässt sich auch aus Fermentationsbrühen direkt isolieren, sofern die Kultivierung der Produzentenstämmen, wie *Streptomyces pilosus* ETTLINGER *et al.*, in eisenarmen Medien erfolgt.

⁷⁾ Desferal®, Markenname der CIBA AG.

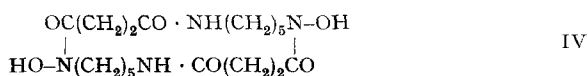
⁸⁾ Vgl. nachfolgende Mitteilungen von G. SCHWARZENBACH & K. SCHWARZENBACH, *Helv.* 46, 1390 (1963), und G. ANDEREGG, F. L'ÉPLATTENIER & G. SCHWARZENBACH, *Helv.* 46, 1400, 1409 (1963).

⁹⁾ H. KEBERLE & H. BICKEL, *Clin. chim. Acta*, in Vorbereitung.

¹⁰⁾ H. BICKEL, B. FECHTIG, G. E. HALL, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG & E. VISCHER, *Helv.* 43, 901 (1960).

Essigsäure abgebaut⁵⁾¹⁰⁾. In neutraler wässriger Lösung verändert es sich bei Raumtemperatur nur sehr langsam, beim Kochen jedoch mit merklicher Geschwindigkeit. Dabei werden offenbar Hydroxamsäuregruppen hydrolytisch gespalten und die entstehenden Hydroxylaminverbindungen durch Kondensations- und Redoxprozesse weiterverändert.

Aus dem nach 5-stündigem Kochen entstandenen Gemisch von mehreren, papierchromatographisch nachweisbaren, in Wasser teilweise schwerlöslichen Abbauprodukten lässt sich eine Verbindung $C_{18}H_{32}O_6N_4$ vom Smp. 218–220° isolieren. Auf Grund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften und des Molgewichtes ihres Acetylderivates kommt ihr die Formel IV zu. Sie



muss aus Desferrioxamin B nach Aufspaltung der beiden endständigen Hydroxamsäuregruppen durch intramolekulare Kondensation entstanden sein.

Nach sehr langem Verkochen in Wasser können papierchromatographisch im wesentlichen nur noch 2 Ninhydrin-positive Substanzen nachgewiesen werden, die als 1,5-Diaminopentan und N-(5-Aminopentyl)-bernsteinsäuremonoamid identifiziert wurden.

Desferrioxamin B reagiert nach SCHOTTEN-BAUMANN mit Säurechloriden und Säureanhydriden. Die dabei entstehenden N,O,O',O''-Tetraacylderivate II lassen sich mit Ammoniak zu den N-Acylderivaten III abbauen (Tab.). Diese Verbindungen, die sich durch Schwerlöslichkeit in Wasser und organischen Lösungsmitteln auszeichnen, zeigen wiederum das typische Komplexbildungsvermögen der Grundsubstanz. Ihre Ferrikomplexe, die mehrheitlich kristallin erhalten wurden, sind, sofern sich der Acylrest nicht von höheren Fettsäuren ableitet, gut wasserlöslich.

Über biologische und pharmakologische Untersuchungen dieser Verbindungen soll an anderer Stelle berichtet werden.

Experimenteller Teil¹¹⁾

1. *Desferrioxamin B und seine Salze.* – *Hydrochlorid:* Eine Lösung von 10 g Ferrioxamin-B-hydrochlorid in 200 ml Methanol wurde mit einer Lösung von 20 g 8-Hydroxychinolin in 200 ml Methanol 4 Std. bei Raumtemperatur stengelassen. Nach Abfiltrieren vom dunkelgefärbten Niederschlag wurde zur Trockne eingengt, mit 200 ml Wasser versetzt und erschöpfend mit Chloroform ausgeschüttelt. Der Eindampfrückstand der gelblichen wässrigen Phase wurde zweimal aus Methanol-Aceton umkristallisiert (7,2 g). Smp. 171–173°. Löslichkeit in H_2O bei 20°:

$C_{25}H_{48}O_8N_6$, HCl	Ber. C 50,28	H 8,27	O 21,43	N 14,07	Cl 5,94%
Gef. „ 50,34	„ 8,21	„ 21,97	„ 14,32	„ 5,78%	

Base: Eine Lösung von 20 g Desferrioxamin-B-hydrochlorid in 1 l Wasser wurde mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/Min. durch eine Säule von 100 ml Dowex-1-X16 (50/100 mesh) von 2,5 cm Durchmesser filtriert. Nach dem Nachwaschen mit 500 ml Wasser und Eindampfen erhielt man 15 g chloridfreien Rückstand, der zur Analyse dreimal aus wässrigem Alkohol umkristallisiert wurde. Smp. 138–140°. Löslichkeit in H_2O bei 20°: 1,2%.

$C_{25}H_{48}O_8N_6$, H_2O	Ber. C 51,88	H 8,71	N 14,52%	Gef. C 52,16	H 8,62	N 14,85%
-------------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Zur Darstellung weiterer Salze wurden 5-proz. Aufschlemmungen von Desferrioxamin B in 40-proz. Methanol mit äquivalenten Mengen wässriger Säure versetzt, wobei Lösung eintrat. Die

¹¹⁾ Die Smp. wurden in der Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Analysenpräparate wurden 20 Std. bei 70°/0,001 Torr über P_2O_5 getrocknet.

Lösungen dampfte man im Vakuum ab und kristallisierte den Rückstand aus wässrigem Alkohol oder aus wässrigem Methanol und Aceton.

Methansulfonat: Smp. 148–149°. Löslichkeit in H₂O bei 20°: > 20%.

$C_{25}H_{48}O_8N_6$, CH_3SO_3H	Ber. C 47,55	H 7,98	N 12,80	S 4,88%
	Gef. „ 47,76	„ 8,04	„ 12,78	„ 4,64%

Sulfat: Smp. 170–172°. Löslichkeit in H₂O bei 20°: 7%.

$C_{25}H_{48}O_8N_6$, $\frac{1}{2}H_2SO_4$	Ber. C 49,25	H 8,10	N 13,78%	Gef. C 49,55	H 8,29	N 13,78%
---	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Oxalat: Smp. 184–186°. Löslichkeit in H₂O bei 20°: 0,2%.

$C_{25}H_{48}O_8N_6$, $\frac{1}{2}C_2H_2O_4$	Ber. C 51,55	H 8,15	N 13,87%	Gef. C 51,56	H 8,46	N 13,79%
---	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

2. *Nachweis*: Desferrioxamin-B-Base, Hydrochlorid und Methansulfonat unterscheiden sich nicht in einer Reihe von Papierchromatographiesystemen. Rf-Werte: Wassergesätt. *n*-Butanol: 0,20 (vergleichsw. Alanin: 0,04); *n*-Butanol-H₂O-Eisessig (4:5:1): 0,72 (Alanin: 0,26); *n*-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser (10:10:2:5): 0,15 (Alanin: 0,26). – Bei der Papierelektrophorese in 0,33*N* Essigsäure wandert Desferrioxamin B bei 9,2 V/cm im Verlauf von 3 Std. 6,3 cm gegen die Kathode (vergleichsw. Alanin: 4 cm).

Desferrioxamin B und seine Salze reagieren mit Ninhydrin unter Violettfärbung. Mit FeCl₃-K₃Fe(CN)₆-Reagens¹²⁾ entsteht eine intensiv blaue, mit dem Reagens nach REINDEL-HOPPE¹³⁾ eine grauviolette und mit Ferrichlorid eine rote Färbung.

3. *Stabilität*: Desferrioxamin-B-methansulfonat ist bei Raumtemperatur in trockenem Zustand Monate, in wässriger Lösung einige Tage unverändert haltbar. Beim Erhitzen in wässriger Lösung wird es relativ rasch abgebaut.

a) 25 g Desferrioxamin-B-methansulfonat wurden unter Stickstoff in 500 ml Wasser 5 Std. unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen schieden sich 2,9 g farblores, schwerlösliches Material aus, das abzentrifugiert wurde. In der gelblichen Lösung liessen sich neben wenig Desferrioxamin-B-methansulfonat (Rf: 0,68) papierchromatographisch mit Ninhydrin 7 Substanzen nachweisen. Rf: 0,15/0,21/0,3/0,35/0,44/0,50/0,62 [System: *n*-Butanol-Wasser-Eisessig (4:5:1)]. Mit FeCl₃-K₃Fe(CN)₆-Reagens¹²⁾ konnte noch ein weiterer Fleck mit Rf: 0,81 nachgewiesen werden. Die Lösung wurde mit Salzsäure auf pH 3 gestellt und mit Chloroform extrahiert. Der getrocknete Extrakt hinterliess nach dem Eindampfen 1,14 g farblosen Rückstand: *Abbauprodukt IV*. Zur Analyse mehrmals aus Methanol und Methanol-Wasser umkristallisiert: längliche Prismen, Smp. 218–220° (Zers.). Rf = 0,81 in *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5).

$C_{18}H_{32}O_6N_4$ (400,46)	Ber. C 53,98	H 8,06	O 23,97	N 13,99%
	Gef. „ 54,20	„ 8,16	„ 24,31	„ 13,67%

IV gibt eine intensiv rote Färbung mit FeCl₃, jedoch keine Reaktion mit Ninhydrin. Schwerlöslich in Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln. Bei der Titration in 80-proz. Methylcellosolve wird ein Puffergebiet in der Region von pH 11 festgestellt. Papierelektrophoretisch sind keine basischen Gruppen nachweisbar. Das in Nujol aufgenommene IR.-Spektrum ähnelt dem des Nocardamins¹⁴⁾.

*Acetylierung von IV*¹⁵⁾: 200 mg IV, in ca. 1 ml Eisessig gelöst, wurden mit 3 ml Essigsäureanhydrid und 5 ml Pyridin 20 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Abdampfen im Hochvakuum setzte man Wasser und Chloroform zu. Der gewaschene und getrocknete Chloroformextrakt lieferte beim Eindampfen farblose Kristalle; aus Methanol 177 mg vom Smp. 223–225° (Zers.). FeCl₃-Reaktion negativ.

$C_{22}H_{36}O_8N_4$	Ber. C 54,53	H 7,49	O 26,42	N 11,56%	MG. 484,5
	Gef. „ 54,65	„ 7,60	„ 26,53	„ 11,57%	„ 470 ¹⁶⁾

¹²⁾ G. M. BARTON, R. S. EVANS & J. A. F. GARDNER, *Nature* **170**, 249 (1952).

¹³⁾ F. REINDEL & W. HOPPE, *Chem. Ber.* **87**, 1103 (1954).

¹⁴⁾ W. KELLER-SCHIERLEIN & V. PRELOG, *Helv.* **44**, 1981 (1961).

¹⁵⁾ Vgl. A. STOLL, J. RENZ & A. BRACK, *Helv.* **34**, 862 (1951).

¹⁶⁾ Thermoelektrische Methode in Methanol. Vgl. W. SIMON & C. TOMLINSON, *Chimia* **14**, 301 (1960).

b) Desferrioxamin-B-methansulfonat wurde in 10-proz. wässriger Lösung 30 Std. unter Ausschluss von Sauerstoff gekocht. Bei der Papierchromatographie erschienen hierauf 2 stark Ninhydrin-positive Flecke, die in 2 Systemen (a, b) gleiche Rf-Werte zeigten wie 1,5-Diaminopentan (a: 0,11, b: 0,68) bzw. N-(5-Aminopentyl)-bernsteinsäuremonoamid¹⁷⁾ (a: 0,40, b: 0,40). a = *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5), b = *n*-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser (10:10:2:5).

4. *N-Acylderivate von Desferrioxamin B (III)*. – *Acylierung mit Säurechloriden*: 0,01 Mol Desferrioxamin-B-Salz wurde bei Raumtemperatur in 100 ml Wasser unter starkem Rühren (Vibromischer) portionenweise innert 30 Min. mit 0,06 Mol eines Säurechlorides in Substanz oder in konzentrierter Chloroformlösung versetzt, wobei das pH des Gemisches durch laufende Zugabe von 5*N* NaOH zwischen 8–9 gehalten wurde. Kurz nach Beginn der Reaktion schied sich jeweils ein öliges Produkt aus, das durch Zusatz von 100 ml Chloroform wiederum in Lösung gebracht wurde. Nach beendeter Reaktion wurden die abgetrennten, gewaschenen und getrockneten Chloroformphasen im Vakuum eingedampft. Die z. T. kristallinen Rückstände (Tetracylderivate II) wurden in 100–300 ml Methanol oder Methanol-Äther-Gemischen gelöst, bei Raumtemperatur mit Ammoniak gesättigt und 15 Std. stehengelassen, wobei sich meistens schon nach kurzer Zeit die schwerlöslichen *N*-Acylderivate III kristallin abschieden. Die Reaktionsgemische wurden im Vakuum eingedampft und die Rückstände zur Entfernung der während der Ammonolyse freigesetzten Amide mit geeigneten Lösungsmitteln ausgekocht.

Die *Acylierung mit Säureanhydriden* wurde gleich, jedoch ohne Zusatz von Chloroform, ausgeführt. Das *N*-Formyldesferrioxamin B wurde mittels des gemischten Anhydrids der Ameisensäure und Essigsäure hergestellt. Unter den angewandten Bedingungen wurden nur die *N*-Acylderivate erhalten, die nach beendigtem Umsatz beim Ansäuern direkt aus der wässrigen Lösung kristallisierten.

Die sowohl in Wasser als auch den meisten organischen Lösungsmitteln sehr schwerlöslichen *N*-Acylderivate liessen sich zur Analyse am besten aus 60-proz. *n*-Propanol umkristallisieren. Smp., Analyse vgl. Tabelle; von den aufgeführten Derivaten zeigt lediglich das Natriumsalz des Bernsteinsäurederivates gute Wasserlöslichkeit.

N-Acylderivate von Desferrioxamin B

Acylrest		Smp. °C	Bruttoformel	Ber. C	H	N%	Gef. C	H	N%
CH ₃ CO–	¹⁸⁾ a)	180–182	C ₂₇ H ₅₀ O ₉ N ₆	53,80	8,36	13,95	53,83	8,47	13,83
<i>n</i> -C ₄ H ₉ CO	a)	181–182	C ₃₀ H ₅₆ O ₉ N ₆	55,88	8,75	13,03	55,91	8,76	12,98
<i>n</i> -C ₁₅ H ₃₁ CO–	a)	188–190	C ₄₁ H ₇₈ O ₉ N ₆	61,63	9,84	10,52	61,80	9,81	10,43
<i>n</i> -C ₂₁ H ₄₃ CO–	a)	191–192	C ₄₇ H ₉₀ O ₉ N ₆	63,91	10,27	9,51	63,69	10,53	9,78
<i>p</i> -C ₆ H ₅ O–C ₆ H ₄ –CH ₂ CO–	¹⁹⁾ a)	184–185	C ₃₅ H ₅₈ O ₁₀ N ₆	58,15	8,09	11,63	58,03	8,02	11,73
HCO–	b)	165–167	C ₂₆ H ₄₈ O ₉ N ₆	53,04	8,22	14,28	52,86	8,33	14,49
HOOC(CH ₂) ₂ CO–	b)	162–164	C ₂₉ H ₅₂ O ₁₁ N ₆	52,71	7,93	12,72	52,59	7,93	12,48
NaOOC(CH ₂) ₂ CO–		155–157	C ₂₉ H ₅₁ O ₁₁ N ₆ Na	51,01	7,53	12,31	50,52	7,82	12,37

a) Acylierung mit Säurechloriden

b) Acylierung mit Säureanhydriden

Die Elementaranalysen, Spektralaufnahmen und Chromatogramme wurden in unseren Speziallaboratorien unter Leitung der Herren Dr. W. PADOWETZ, Dr. R. F. ZÜRCHER und E. VON ARX ausgeführt.

SUMMARY

Chemical and physical properties of desferrioxamin B, the iron free ground substance of ferrioxamin B, are described.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT
Pharmazeutische Abteilung, Basel

¹⁷⁾ Dargestellt durch Umsatz von 1 Mol Bernsteinsäureanhydrid mit 1 Mol 1,5-Diaminopentan.

¹⁸⁾ Vgl. auch W. KELLER-SCHIERLEIN & V. PRELOG, *Helv.* **44**, 709 (1961).

¹⁹⁾ *p*-Äthoxyphenylacetylchlorid (Sdp. 108–110°/0,1 Torr) wurde aus der Säure [A. WERNER, *Liebigs Ann. Chem.* **322**, 149 (1902)] mit Thionylchlorid in Benzol hergestellt.