

166. Rudolf Tschesche, Gernot Grimmer und Fritz Neuwald:
Über pflanzliche Herzgifte, XX. Mitteil.: Gitorin, ein neues Glykosid aus
***Digitalis lanata* und über ein quantitatives Mikrobestimmungsverfahren**
für Aglykone und Zucker in Glykosiden vom Typ der Fünfringlactone*)

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität und aus dem Laboratorium für Arzneimittelprüfung und -forschung, Hamburg]

(Eingegangen am 7. Mai 1952)

Aus den Blättern von *Digitalis lanata* wurde ein neues Glykosid „Gitorin“ isoliert, Gitoxigenin und 1 Mol. Glucose enthaltend, ferner das Vorliegen von 16-Acetyl-digitalinum verum sehr wahrscheinlich gemacht. Es wird ein quantitatives Verfahren der Mikrobestimmung von Aglykonen des Fünfringlacton-Typs angegeben, das auf der Vermessung der Extinktionshöhe im Maximum der Absorption beruht. Bei Gitoxigenin-Derivaten kann der ermittelte Wert durch Bestimmung der Höhe des Absorptionsmaximums bei 338 m μ kontrolliert werden, das die leicht herstellbare Dianhydro-Verbindung des Gitoxigenins zeigt. Die Zucker in Herzgift-Glykosiden lassen sich im Anschluß an ein Verfahren von Holzman u. Mitarb. quantitativ aus den Färbungen im Spektrophotometer bestimmen, die sie in 66-proz. Schwefelsäure mit Carbazol ergeben. Damit lassen sich auch 2 Zucker nebeneinander quantitativ bestimmen, wenn die Absorptionsmaxima genügend Unterschiede in der Lage aufweisen. Das Verfahren zeichnet sich durch besondere Empfindlichkeit aus.

Aus den Blättern von *Digitalis lanata* sind bisher 3 genuine Glykoside genauer bekannt, Digilanid (Lanatosid) A, B und C, in denen nach Stoll und Mitarbb.¹⁾ Digitoxigenin, Gitoxigenin und Digoxigenin mit je 3 Moll. Digitoxose und einem Mol. Glucose und Essigsäure verknüpft sind. Von W. Mauss²⁾ wurde ferner das Glykosid „Digitalinum verum“ wahrscheinlich gemacht, in dem Gitoxigenin an Digitalose und Glucose gebunden ist. Nach P. Mohs³⁾ soll dieses Glykosid ebenfalls als Monoacetyl-Derivat vorkommen. In den letzten Jahren hat der eine von uns (F. Neuwald)⁴⁾ in einer Reihe von Arbeiten darauf hingewiesen, daß bei der parenteralen Auswertung von wäßrigen Auszügen aus den Blättern von *Digitalis purpurea* im Tierversuch im wesentlichen nicht die bekannten spezifisch herzwirksamen Glykoside vom Digilanid(Lanatosid)-Typ, sondern noch unbekannte Stoffe toxischer Natur bestimmt werden. In unveröffentlichten Untersuchungen wurden in den Blättern von *Digitalis lanata* ebenfalls solche Stoffe festgestellt, welche die übliche biologische Wertbestimmung ganz wesentlich beeinflussen⁵⁾.

*) Hrn. Professor Dr. E. Keeser, Hamburg, zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹⁾ A. Stoll, A. Hofmann u. A. Helfenstein, *Helv. chim. Acta* **18**, 644 [1935].

²⁾ Inaugural-Dissertat. Berlin 1930. ³⁾ *Arch. Pharmaz.* **271**, 393 [1933].

⁴⁾ *Arch. Pharmaz.* **283**, 93 [1950]; G. Zöllner, A. Diekmann u. F. Neuwald, ebenda **283**, 265 [1950]; F. Neuwald u. A. Diekmann, *Arch. exper. Pathol. Pharmaz.* **211**, 385 [1950].

⁵⁾ Die Tierversuche wurden im Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg (Direktor Prof. Dr. E. Keeser) von Hrn. Dr. Zöllner u. Frhn. Dr. Diekmann durchgeführt, denen wir hier besonders danken möchten.

Ferner erschien 1948 eine Arbeit von K. Tamura, Y. Kobayashi und K. Tokita⁶⁾, die in dieser Pflanze ein neues Glykosid aufgefunden haben wollen, das nach den bisherigen Erfahrungen der Chemie der herzwirksamen Glykoside ungewöhnliche Eigenschaften aufwies. Im „Digicorin“ fanden sie Gitoxigenin an Digicuronsäure, eine 2-Desoxyhexuronsäure, gebunden vor; die Bindung vermittelt die Aldehydgruppe dieser Säure durch Glykosidierung mit der OH-Gruppe an C¹⁶ in Aglykon, während 1 Mol. Essigsäure an das OH an C³ geknüpft sein soll. Auf Grund der freien Carboxygruppe der Digicuronsäure kommen dem neuen Glykosid angeblich saure Eigenschaften zu⁷⁾.

Es schien daher wünschenswert, die Untersuchung der Blätter von *Digitalis lanata* erneut aufzunehmen. Wir berichten in dieser Arbeit zunächst über die bevorzugt wasserlösliche Fraktion aus dem methanolischen Extrakt der Blätter, der mit Bleiacetat vorgereinigt und mit Chloroform von Digilaniden (Lanatosiden) befreit worden war.

Diese, im Tierversuch immer noch stark toxisch wirkende Fraktion, konnte durch Adsorption an Carboraffin von den wirksamen Bestandteilen befreit werden, die sich von der Kohle mit Aceton verhältnismäßig einfach zurückgewinnen ließen. Das Eluat, das etwa 60% der toxischen Fraktion im Tierversuch enthielt, wurde nach dem Entfernen des Acetons erschöpfend mit Chloroform ausgeschüttelt, um noch mitgeführte Farbstoffe zu entfernen, und schließlich wurden die toxisch wirkenden Bestandteile mit Chloroform-Äthanol (1 : 1) der wäßrigen Phase entzogen. Durch Adsorption an einem 10–15fachen Überschuß von alkalifreiem Aluminiumoxyd nach dem Durchlaufverfahren, wobei die Substanz in Chloroform mit 8% Methanol-Zusatz auf die Säule gebracht wurde, konnte ein Drittel als unwirksames Öl entfernt werden. Es hinterblieb eine Reihe von Fraktionen, die einen positiven Legal-Test auf Herzgifte gaben. Sie wurden vereinigt und einer Gegenstromverteilung über 24 Stufen im System Wasser-Äthanol-Chloroform (1 : 0.834 : 1) unterworfen (Verteilung I, Beschreibung der Apparatur s. im Versuchsteil). Die Verteilung wurde noch einmal mit dem Inhalt der Kammern 3–12 (Verteilung II) und 13–23 (Verteilung III) für sich wiederholt. Das Lösungsmittelgemisch im Fall II war 12 Tle. Wasser, 13.5 Tle. Äthanol und 15 Tle. Chloroform, bei III 15 Tle. Wasser, 8.5 Tle. Äthanol und 12 Tle. Chloroform. Nur aus der Verteilung III konnten bisher einheitliche Verbindungen isoliert werden; über die aus der Wiederholung II erhaltenen Stoffe werden wir in einer späteren Arbeit berichten.

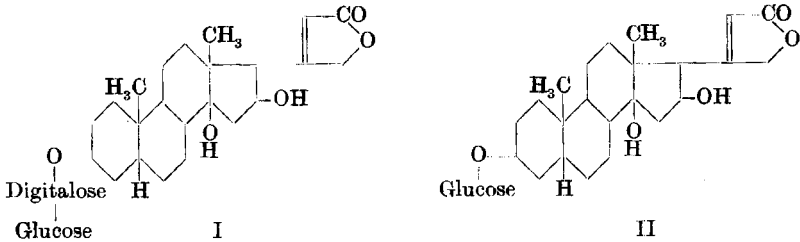
Die chemische Untersuchung der z. Tl. nur amorph, in Form der Acetate aber stets kristallisiert erhaltenen Verbindungen zeigte, daß neben Digitalinum (I) bzw. einem Derivat desselben und Gitoxigenin ein neues Glykosid vorliegt, dem wir den Namen Gitorin (II) geben möchten. Das neue Glykosid läßt sich nur sehr schwer von „Digitalinum verum“ abtrennen; die Isolierung in reiner Form gelang erst durch sehr sorgfältige Chromatographie der Acetate an Aluminiumoxyd. Gitorin ist ein Gitoxigenin-Derivat, in dem das Aglykon mit nur einem Molekül Glucose verbunden ist. Dadurch ließ es sich auch, entsprechend unseren bisherigen Erfahrungen, mit Fermentpräparaten aus *Aspergillus oryzae* zerlegen. Gitorin konnte bisher nicht in deutlichen Kristallen erhalten werden und ähnelt darin dem Digitalinum verum; das Pentaacetat kristallisierte jedoch gut (Schmp. 184–189°, $[\alpha]_D^{20} : +5^\circ$). Die intravenöse Toxizität wurde in wäßr.-alkohol. Lösung von Dr. K. K. Chen⁸⁾ zu 0.4372 ±

⁶⁾ Jap. Med. Journ. 1, 206 [1948].

⁷⁾ Nach einer Privatmitteilung von Dr. G. Zöllner, Bad Nauheim, die er von Prof. T. Fukuda, Fukuoka, Japan, erhielt, scheinen die genannten japanischen Autoren Schwierigkeiten mit der Reproduktion ihrer früheren Befunde zu haben.

⁸⁾ Wir möchten Hrn. K. K. Chen, Indianapolis, auch an dieser Stelle bestens für seine Bestimmungen danken, die uns eine sehr wertvolle Hilfe waren.

0,0265 mg/kg Katze (10 Tiere) bestimmt. Der von Chen erhaltene Wert lag allerdings bei 0,5496, das ihm von uns übersandte amorphe Material war jedoch auf Grund der UV-Messung nur 80-proz. an unverändertem Herzgift, so daß sich die vorgenommene Korrektur als notwendig erwies.



Das Vorkommen von freiem Gitorin in der von uns verarbeiteten Fraktion ist auffällig, wenn die gefundenen Mengen auch gering sind (etwa 0,0002% ber. auf die trockene Droge), denn durch die Extraktion mit Chloroform sollten sie eigentlich aus der Lösung entfernt sein. Es scheint möglich, daß dieses Gitorin einer Hydrolyse des Gitorins oder eines anderen Gitoringlykosides bei der Aufarbeitung seine Entstehung verdankt.

Gitorin und „Digitalinum verum“ bilden ein durch Kristallisation nicht trennbares Gemisch. Erschwerend wirkt hierbei, daß keine der Komponenten deutlich kristallisiert. O. Schmiedeberg⁹⁾, H. Kiliani¹⁰⁾ und A. Windaus¹¹⁾ berichten von ihren Präparaten von Digitalinum verum, daß sie nur amorph wären. Auch W. Rittel, A. Hunger und T. Reichstein¹²⁾ geben in einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung an, daß ihre Präparate aus den Samen von *Digitalis purpurea* und *lanata*, die über das kristallisierte Hexaacetat gewonnen worden waren, amorph blieben. Dagegen kristallisierte ein Monoacetat des Digitalinum verum. Mauss²⁾ isolierte aus den Blättern von *Digitalis lanata* ein Glykosid, das er für Digitalinum verum hielt, konnte aber darin die Digitalose nicht mit Sicherheit identifizieren. Mohs³⁾, der sehr wahrscheinlich die gleiche Substanz untersuchte, hielt sie für ein Monoacetat, obwohl die Acetylwerte zu niedrig lagen; die Verbindung war ebenfalls amorph. Diese Feststellung ist auffällig, da Reichstein und Mitarbb. ihr Monoacetyl-digitalinum verum ausdrücklich als kristallisiert bezeichnen. Für ein von uns hergestelltes Präparat von Digitalinum verum aus den Blättern beobachtete K. K. Chen⁵⁾ eine Toxizität von 1.409 ± 0.1611 mg/kg Katze (10 Tiere), übereinstimmend mit den Angaben der Literatur (1.332 ± 0.193 mg/kg)¹²⁾. Dagegen findet er in 2 Präparaten von Reichstein¹²⁾ des Monoacetates von Digitalinum verum 3.331 bzw. 3.843 ± 0.284 mg/kg Katze. Da wir in unserem „Digitalinum verum“ die Digitalose auch papierchromatographisch nachweisen konnten, kann an dem Vorkommen von Digitalinum verum oder einem Derivat desselben in den Blättern nunmehr kein Zweifel mehr sein. Das rohe Gemisch von Gitorin und „Digitalinum verum“ vor der Trennung über die Acetate zeigte eine Toxizität von $0.4826 \text{ mg} \pm 0.0337$ nach Chen. Danach muß dem Gitorin eine wesentlich toxischere Substanz als Digitalinum verum oder das Monoacetat von Reichstein beigemischt sein. Diese giftigere Verbindung halten wir zwar auch für ein Monoacetat dieses Glykosids, wobei die Acetylgruppe wegen der großen Toxizitäts-

⁹⁾ Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **3**, 16, 274 [1874], **16**, 162 [1883].

¹⁰⁾ Arch. Pharmacol. **230**, 250 [1892], **233**, 299 [1895], **252**, 16 [1914]; B. **31**, 2460 [1898], **51**, 1633 [1918], **53**, 244 [1920], **55**, 90 [1922].

¹¹⁾ A. Windaus u. E. Haack, B. **62**, 475 [1929].

¹²⁾ Helv. chim. Acta **35**, 434 [1952].

unterschiede jedoch eine andere Stellung im Molekül einnehmen muß. Im Acetat von Reichstein ist mit großer Wahrscheinlichkeit eine Oxygruppe der Digitalose durch Essigsäure verschlossen.

Eine Acetyl-Bestimmung des anfallenden Gemisches von Gitorin und „Digitalium verum“ zeigte Werte von 1.99 und 1.4 % Acetyl; dieser Befund ist für reines Monoacetyl-digitalinum verum zu niedrig (ber. 5.54 %). In Anbetracht der Tatsache, daß das Gemisch zum größeren Teil aus Gitorin bestand, müßte der Rest Monoacetyl-digitalinum verum sein; die Acetylgruppe könnte an das OH an C¹⁶ gebunden sein. CH₃CO an dieser Stelle bringt eher eine Steigerung als eine Senkung der Toxizität hervor, wie der Vergleich von Oleandrin und Desacetyl-oleandrin beweist (0.20 ± 0.008 und 0.308 ± 0.016 mg/kg Katze)¹³). Mit dieser Auffassung steht in Einklang, daß sich bei dem Gemisch von Gitorin und 16-Acetyl-digitalinum verum aus letzterem an Aluminiumoxyd Essigsäure abspalten ließ, wie leicht aus der Bildung eines konjugierten Systems von Doppelbindungen (UV-Absorption bei 270 m μ) erkennbar wird. Nicht acetylierte Gitoxigenin-Derivate zeigen ein ähnliches Verhalten nicht¹⁴). Die Ansicht von Mohs³), daß das Digitalinum verum in den Blättern von *Digitalis lanata* als Monoacetyl-Derivat vorliegt, hat sich also bestätigen lassen, seine zu niedrigen Acetylwerte sind auf das beigemengte Gitorin zurückzuführen. Auch die schwankenden Methoxylwerte in den Präparaten von Mauss²) sind dadurch nunmehr verständlich.

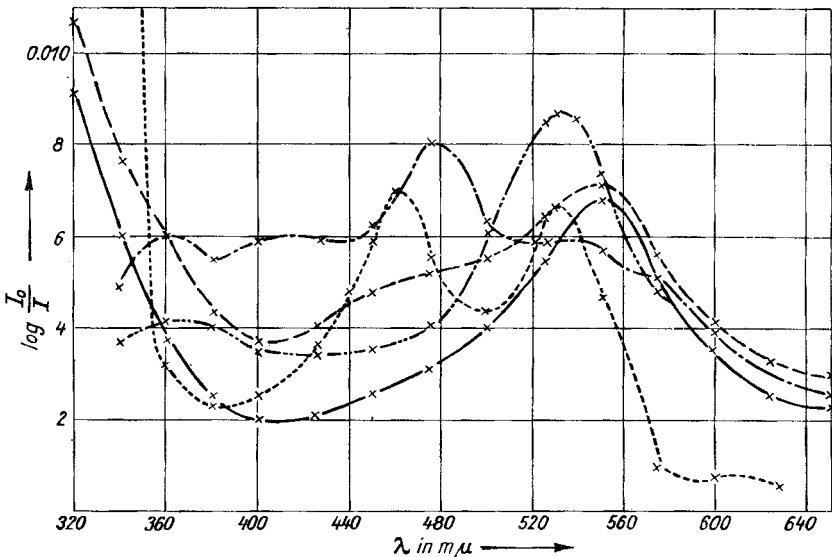
Der Gehalt an Gitorin in den Blättern würde sich nach den Mengen, die wir isolieren konnten, in der Größenordnung von 0.0005–0.001 %, bezogen auf getrocknete Droge, bewegen. Er erwies sich in verschiedenen Versuchsansätzen als schwankend, und wir möchten annehmen, daß er in der Pflanze wesentlich höher liegt. Die Auffindung des Gitorins vermag vielleicht ein Licht auf die biochemische Bildung von Digilanid (Lanatosid) B und von Digitalinum verum in der Pflanze zu werfen, und man ist geneigt, zu vermuten, daß in ihm ein Primärprodukt vorliegt. Die isolierten Mengen von Digitalinum verum-monoacetat-(16) bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie die von Gitorin.

Bei der Bearbeitung der einzelnen Fraktionen aus der Gegenstromverteilung hat sich ein quantitatives Bestimmungsverfahren für Gitoxigenin und andere Aglykone bewährt, das in der Messung der Extinktionshöhe beim Maximum des ungesättigten Lactonringes beruht. Beim Gitoxigenin kann das Ergebnis sehr vorteilhaft kontrolliert werden durch Herstellung der Dianhydroverbindung, deren Maximum bei 338 m μ liegt und hier weniger von Begleitstoffen beeinflusst wird. Für die Bestimmung ist die Herstellung der freien Genine vor der Messung notwendig. Die Methode scheint für alle Genine brauchbar, sobald das Aglykon bekannt ist und seine Extinktionshöhe im Maximum ermittelt wurde. Die Fehlergrenze liegt in der Größenordnung von einigen Prozenten.

¹³) K. K. Chen, R. C. Anderson u. E. B. Robbins, Journ. Amer. Pharmac. Assoc. 26, 214 [1937], 27, 113 [1938].

¹⁴) K. Meyer, Helv. chim. Acta 29, 718 [1946]; A. Hunger u. T. Reichstein, ebenda 33, 76 [1950]; A. Aebi u. T. Reichstein, ebenda 33, 1013 [1950].

Zur quantitativen Bestimmung der abhydrolysierten Zucker haben wir uns einer Methode bedient, die von Holzman und Mitarbb.¹⁵⁾ bisher allein für Hexosen verwendet wurde und die in der Umsetzung mit Carbazol in konz. Schwefelsäure besteht. Geeigneter erwies sich in unseren Händen 66-proz. Säure, da dadurch die Genauigkeit verbessert wird und u.U. Spuren von Genuinen, die noch in die Zucker-Lösung gelangt sind, damit im allgemeinen keine Färbungen geben. Die mit Methylpentosen, 2-Desoxy-methylpentosen und ihren Methyläthern erhaltenen Farbstoffe lassen sich zwischen 320 und 650 $m\mu$ messen und ihre Absorption ist für die einzelnen Zucker mehr oder weniger charakteristisch. Besonders die mit Glucose und Rhamnose bzw. Digitoxose erhaltenen Färbungen unterscheiden sich im Spektrum derart, daß beide Zucker jeweils durch Messung ihrer Maxima nebeneinander ohne vorherige Trennung bestimmt werden können. So ließen sich im Transvaalin aus *Urginea burkei*, über das wir demnächst berichten werden, Glucose und Rhamnose gleichzeitig bestimmen. Die Konzentrations-Abhängigkeit steht in linearer Abhängigkeit von der Extinktionshöhe, die Genauigkeit der Erfassung beträgt 1–2%, selbst wenn man nur 0.015 mg Zucker zur Bestimmung verwendet. Das nachstehende Kurvenbild (Abbild. 1) zeigt die Spektren der Reaktionsprodukte von 5 verschiedenen Zuckern mit Carbazol.



Abbild. 1. UV-Spektren der Reaktionsprodukte von je 0.01 mg Glucose \times — \times — \times , Galaktose \times — \times — \times , Rhamnose \times — \times — \times , Digitoxose \times — \times — \times , Ribose \times — \times — \times mit Carbazol

Wir danken der Chemisch-Pharmazeutischen Fabrik P. Beiersdorf & Co. für die Überlassung der Mutterlaugen der Herstellung von Pandigal und der eine von uns (G. Grimmer) dem Fonds der Chemie für die Gewährung eines Stipendiums.

¹⁵⁾ G. Holzman, R. v. MacAllister u. C. Niemann, Journ. biol. Chem. 171, 27 [1947].

Beschreibung der Versuche

Als Ausgangsmaterial dienten die Ablaugen der Pandigal-Fabrikation von P. Beiersdorf & Co., Hamburg, aus 1250 kg getrockneter Blätter von *Digitalis lanata*, die in 3 Anteilen verarbeitet wurden. Sie stammten aus einem alkohol. Extrakt des Pflanzenmaterials, der die übliche Reinigung mit Bleiacetat (2mal) erfahren hatte. Die nach der Entfernung des Bleis mit Ammoniumsulfat und Entfernung der Digilanide (Lanatoside) mit Chloroform verbleibende wäßr.-alkohol. Lösung bildete das Ausgangsmaterial für diese Arbeit.

1250 l dieser Ablauge wurden mit 250 kg Carboraffin verrührt, bis der bittere Geschmack der Ausgangs-Lösung im Kohlefiltrat verschwunden war. Dann wurde die Kohle abgesaugt, mit Wasser gewaschen und die adsorbierten toxischen Bestandteile von der Kohle durch Verrühren mit Aceton (in mehreren Anteilen mit insges. 2000 l) eluiert. Der Acetonextrakt wurde i. Vak. auf etwa 150 l eingeengt. Die verbleibende wäßr. Lösung wurde zunächst durch mehrmaliges Ausschütteln mit Chloroform von Verunreinigungen befreit und mit Chloroform-Äthanol (1:1) erschöpfend extrahiert. Der Rückstand des Extraktes belief sich auf etwa 2 kg. Er wurde in 10 l Chloroform mit 7% Methanol gelöst und diese Lösung in mehreren Anteilen über eine Säule von alkalifreiem Aluminiumoxyd (insges. 20 kg) nach dem Durchlaufverfahren chromatographiert. Beim Nachwaschen mit dem gleichen Lösungsmittel-Gemisch erschienen zuerst ölig bleibende Fraktionen

(etwa $\frac{1}{3}$ des Ausgangsmaterials), die verworfen wurden. Beim Erhöhen des Methanolanteils auf 15% des Chloroforms hinterließen die folgenden Fraktionen nach dem Eindampfen einen gelblich gefärbten, glasigen Schaum. Auf Zusatz von 30% Methanol wurde eine weitere Fraktion gewonnen, die etwas stärkere Färbung zeigte. Beide Fraktionen gaben einen positiven Farb-Test nach Legal mit Nitroprussidnatrium und Alkali und wurden weiter verarbeitet; scharf getrocknet wogen sie 505 g. Die mit reinem Methanol und mit Methanol + 1% Essigsäure vom Aluminiumoxyd ablösbaren Anteile gaben nur noch einen schwachen Legal-Test und wurden nicht weiter untersucht (etwa $\frac{2}{5}$ des Ausgangsmaterials).

r	I mg	II mg	III mg
0	327	139	189
1	355	116	285
2	380	138	398
3	395	168	547
4	474	204	741
5	442	278	935
6	484	379	1135
7	536	507	1307
8	525	707	1380
9	515	779	1450
10	570	927	1435
11	558	990	1179
12	616	1022	1055
13	636	1008	874
14	670	931	684
15	666	856	519
16	733	790	341
17	703	593	286
18	678	478	210
19	627	325	187
20	533	227	170
21	415	139	163
22	350	85	120
23	306	69	—
24	463	—	—
	13.046 g	12.057 g	15.590 g

gefunden. Die Gewichtstabelle der Verteilungen I—III ergab bei einer eingesetzten Menge von 13.046 g obenstehendes Bild.

Für Verteilung II und III wurde das Material zweier Verteilungen I eingesetzt.

Eine Durchrechnung der Verteilungskurve bei II und III unter Zugrundelegung der ermittelten Verteilungs-Koeffizienten nach dem Ausdruck

$$\log T_{n,r} = \log T_{n,r-1} + \log \frac{n+1-r}{r} + k,$$

wobei der erste Term zu

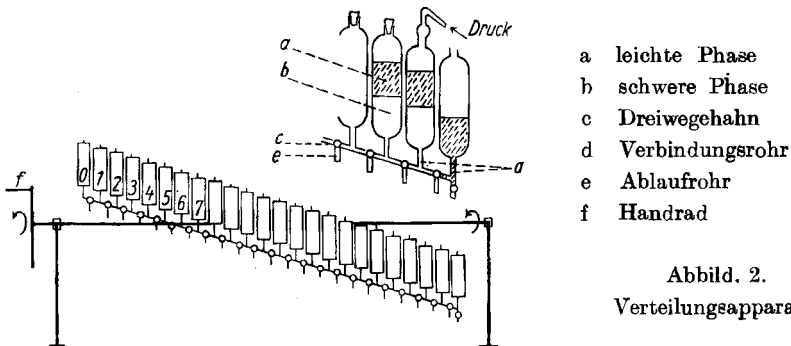
$$\log T_{n,r} = 0 = -n \log (1+k)$$

gefunden wurde ($T_{n,r}$ bezeichnet den laufenden Term, Gewicht der Kammerinhalte, r die laufende Nummer, n die Anzahl der Verteilungsschritte und k den Verteilungskoeffizienten)¹⁶⁾, ergab eine erhebliche Abweichung der experimentell gefundenen von den theoret. errechneten Werten. Es mußte also noch ein Gemisch mehrerer Stoffe trotz des einen beobachteten Maximums vorliegen.

Verteilungsapparat¹⁷⁾

Die Apparatur besteht aus 24 starr miteinander verbundenen Schütteltrichtern, die um eine Achse drehbar angeordnet und durch ein Glasrohr verbunden sind (s. die Abbild. 2). Die einzelnen Kammern können durch einen Dreiweghahn (c) getrennt werden. Durch das Ablaufrohr e kann jede einzelne Kammer für sich entleert werden. In der Teilabbildung rechts ist die Überführung der schweren Phase von Kammer 0 in 1 wieder gegeben, entsprechend erfolgt die von 1 nach 2 und so fort.

Das zu verteilende Substanzgemisch wird in der Kammer Nr. 0 gelöst, durch Drehen des Handrades (f) zwischen beiden Phasen verteilt und die schwere Phase durch leichten Überdruck in die Kammer 1 abgedrückt, die schon leichte Phase enthält. In Kammer 0



Abbild. 2.
Verteilungsapparat

wird die entfernte schwere Phase durch neue, substanzfreie ersetzt. Nach dem Verschluss der Kammern durch gesicherte Schlifftopfen kann durch Drehen des Handrades die Verteilung der eingesetzten Substanzmischung zwischen beiden Phasen erzielt werden. Nach dem Absetzen wird die schwere Phase von Kammer 1 in 2 übergeführt, die schon neue leichte Phase enthält, und ebenso von 0 in 1 gebracht. In 1 wird neue schwere Phase nachgefüllt und wieder die Vermischung durch Drehen des Handrades vollzogen. In der gleichen Weise ist weiter zu verfahren, bis die Substanz in allen 24 Kammern der Apparatur ihre Verteilung gefunden hat.

Der Vorteil der Apparatur ist die exakte Phasentrennung bei der Überführung von Kammer zu Kammer und die Möglichkeit, die Volumenverhältnisse der Phasen in den Gefäßen beliebig zu verändern. Man ist nicht darauf angewiesen, für beide Phasen gleiche Volumina zu verwenden. Der Verzicht bei dieser Apparatur auf Vollautomatik ist vor allem auf Grund der großen Neigung zur Schaumbildung bei Pflanzenextrakten erfolgt.

Isolierung des Gemisches von Gitorin (G.) und 16-Acetyl-digitalinum verum (A.)

Die Eindampfrückstände der Kammerinhalte 2-9 der Verteilung III ergaben beim Lösen in 300 ccm Aceton 4.6 g eines farblosen, nicht deutlich kristallisierenden Bodenkörpers,

¹⁶⁾ P. Karlson u. E. Hecker, Ztschr. Naturforsch. 5b, 237 [1950].

¹⁷⁾ Die Apparatur wurde von Dr. F. Korte und K. H. Brathge in der Biochem. Abteilung des Chem. Staats-Instituts entwickelt.

der bei 185–209° schmolz. Er wurde in Tetrahydrofuran gelöst, die Lösung i. Vak. auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Äther versetzt. Danach lag der Schmelzpunkt des Glykosidgemisches bei 220–221°; $[\alpha]_D^{20}$: +1° (c = 1.04, Methanol).

G. C ₂₉ H ₄₄ O ₁₀ (552.6)	Ber. C 63.02	H 8.03	OCH ₃ 0	CH ₃ CO 0
A. C ₃₈ H ₅₈ O ₁₅ (754.8)	Ber. C 60.41	H 7.74	OCH ₃ 4.14	CH ₃ CO 5.70
	Gef. C 60.06, 59.70	H 7.92, 7.80	OCH ₃ 3.19, 3.00	CH ₃ CO 1.99, 1.4

Wahrscheinlich enthält das Substanzgemisch noch Kristallwasser sehr fest gebunden, so daß die C-Werte zu niedrig liegen.

10 mg des Glykosidgemisches wurden in Methanol gelöst und an einer Säule von 500 mg Aluminiumoxyd (Aktiv.-Stufe 1) adsorbiert. Nach 10 Tagen wurde die Substanz mit Methanol + 1% Essigsäure eluiert. Es wurden amorphe Flocken gewonnen, die ein Absorptionsmaximum bei 270 m μ aufwiesen, entsprechend dem von 16-Anhydro-gitoxigenin-Derivaten.

Auftrennung des Gemisches über die Acetate

Das Glykosidgemisch (5.284 g) wurde ohne vorherige Reinigung in der üblichen Weise mit Essigsäureanhydrid und Pyridin in die Acetate übergeführt. Bei der papierchromatographischen Untersuchung an mit Formamid getränktem Filtrierpapier (Schleicher und Schüll Nr. 2043 b) mit Benzol als beweglicher Phase wurden nach der Sichtbarmachung mit Trichloressigsäure 2 Flecke mit den R_F-Werten 0.79 und 0.92 gefunden¹⁸⁾. Zur Auftrennung der Acetate wurde an 50 g alkalifreiem Aluminiumoxyd nach dem Durchlauf-Verfahren chromatographiert. Aufgebracht wurde das Acetatgemisch auf die Säule in Benzol; mit je 150 ccm Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch wurden folgende Fraktionen erhalten:

1.) Benzol	Legal-Test positiv	3.392 g
2.) " "	" "	0.234 "
3.) " + 20% Chlf.	" "	0.245 "
4.) " + 20% "	" "	0.136 "
5.) " + 50% "	" "	0.742 "
6.) " + 50% "	" "	0.527 "
7.) " + 50% "	" "	0.130 "
8.) Chlf.	" "	0.221 "
9.) " "	" "	0.160 "
10.) " + 1% Methanol	" "	0.678 " (nicht krist.)

Weitere Fraktionen mit größerem Methanolzusatz zum Chloroform enthielten keine Substanz mit positivem Legal-Test mehr. Die Fraktionen 1 und 2 ergaben mit Aceton-Äther-Petroläther aus den 1250 kg Droge insgesamt 5.050 g Kristalle von Gitorin-pentaaacetat vom Schmp. 160–164°. Beim Umkristallisieren aus Methanol erschien das Acetat in schön ausgebildeten Nadeln, die bei 185–190° schmolzen. Die Fraktionen 5–7 lieferten 710 mg krist. Digitalinum-verum-hexaacetat vom Schmp. 166–174°.

Gitorin-pentaaacetat: Nach Untersuchung von Dr. Schröder¹⁹⁾ handelt es sich bei diesem Kristallinat vermutlich um rhombische Kristalle, Breite 0.005–0.016 mm, Länge 0.05–0.16 mm, die bei der Betrachtung unter dem Mikroskop die beiden Breitseiten eines Prismas zeigen. 2 Arten von Kristallen ließen sich unterscheiden: 1.) n $_{\alpha}$ parallel zur Längsachse n $_{\gamma}$ = 1.519, 2.) n $_{\alpha}$ parallel zur Längsachse n $_{\gamma}$ = 1.519.

$[\alpha]_D^{20}$: +5° (c = 0.977, Methanol).

Zur Analyse wurde die Substanz i. Hochvak. bei 100° getrocknet, wobei sie ein halbes Mol. Wasser abgab; trotzdem wurden für die wasserfreie Verbindung stets zu niedrige C-Werte gefunden, doch stimmten die Analysen von Substanzen verschiedener Herstellung befriedigend in ihren Werten überein.

C ₃₉ H ₅₄ O ₁₅ (762.8)	Ber. C 61.40	H 7.14
C ₃₉ H ₅₄ O ₁₅ + 1 H ₂ O (780.8)	Ber. C 60.68	H 7.18
	Gef. C 60.68, 60.35, 60.34	H 7.40, 7.04, 7.16 OCH ₃ 0

¹⁸⁾ A. B. Svendsen u. K. B. Jensen: *Pharmac. Acta Helv.* 25, 241 [1950].

¹⁹⁾ Mineralog. Institut der Universität Hamburg.

Das UV-Spektrum zeigte ein Maximum bei 216 μ ($\log \epsilon = 4.15$). Der R_F -Wert an mit Formamid getränktem Papier mit Benzol als beweglicher Phase lag bei 0.92²⁰).

Gitorin: 1.60 g Gitorin-acetat wurden in 160 ccm Methanol gelöst und mit einer Lösung von 1.6 g Natriumhydrogencarbonat in 32 ccm Wasser 10 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach ergab die Ausschüttelung mit Chloroform-Äthanol (1 : 1) 1.05 g Gitorin, das wenig Neigung zur Kristallisation zeigte. Aus Methanol-Wasser schied sich nach 3 Wochen ein farbloses Pulver ohne erkennbare Kristallstruktur ab, das nach zweimaligem Umlösen in gleicher Weise den Schmp. 205–212° aufwies; $[\alpha]_D^{20}$: +7° ($c = 1.307$, Methanol). Mit konz. Schwefelsäure trat zunächst eine gelbe, dann eine karmirrote Färbung auf. Wegen der schlechten Kristallausbildung und der vermutlichen festen Kristallwasser-Bindung wurde auf eine Analyse verzichtet.

Spaltung mit Festal: 50 mg Gitorin wurden in 50 ccm Wasser gelöst und mit 50 mg Festal²¹) versetzt. Nach Zugabe von 1 ccm Toluol wurde die Mischung 6 Tage stehengelassen. Die Aufarbeitung lieferte 18 mg krist. Gitoxigenin, nachdem der chloroformlösliche Teil der Spaltung über Aluminiumoxyd chromatographiert worden war; Schmp. 220–225°, der Misch-Schmelzpunkt mit authentischem Material zeigte keine Erniedrigung. Gitoxigenin wurde ferner papierchromatographisch mit Chloroform-Methanol-Wasser (10 : 2 : 5) mit dem R_F -Wert 0.82 identifiziert. Eine auf dem gleichen Papier parallel entwickelte Probe Gitoxigenin bekannter Herkunft lieferte den gleichen Wert. In der wäbr. Phase der Spaltung konnte als einziger Zucker Glucose papierchromatographisch ermittelt werden (R_F -Wert 0.18 in Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5)). Die Sichtbarmachung der Glucose auf dem Papier wurde mit Anilinothylal vorgenommen.

Mikrospaltung mit nH_2SO_4 : 1–5 mg Gitorin-acetat wurden in einem kleiner Saugröhrchen in 0.5 ccm Methanol gelöst und die Lösung mit der gleichen Menge $2n H_2SO_4$ versetzt. Unter Verschluss des Röhrchens mit einem Kühlfinger wurde die Mischung 2 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Dann wurde das Methanol i. Vak. abgetrieben und die Lösung mit Wasser wieder auf 1 ccm aufgefüllt. Anschließend wurde 30 Min. in der gleichen Weise nachhydrolysiert. Die Lösung wurde 3 mal mit Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroform-Phase mit einer Capillarpipette entfernt. Die vereinigten Chloroform-Extrakte wurden in einem 50-ccm-Meßkolben gesammelt und im Exsiccator über Silikagel i. Vak. zur Trockne gedampft. Der Rückstand wurde in 50 oder 100 ccm spektralreinem Äthanol (je nach Einwaage) gelöst und im Spektrophotometer die Extinktionshöhe ($\log I_0/I$) gemessen. Bei einer Einwaage von 1.975 mg bzw. 1.830 mg wurden in 50 ccm Äthanol bei 338 μ (Maximum der Absorption des Dianhydro-gitoxigenins) $\log I_0/I$ zu 760 und 745 gefunden, entspr. 89 bzw. 93% d. Th. auf die Zusammensetzung $C_{39}H_{54}O_{15}$ berechnet. Vorher war an reinem Gitoxigenin der $\log \epsilon$ -Wert für Dianhydrogitoxigenin in 6 Bestimmungen in gleicher Weise zu 4.24 ermittelt worden.

Dieses Verfahren konnte auch für andere Aglykone in gleicher Weise verwendet werden, wobei im allgemeinen das Maximum der ungesättigten Lactongruppierung (um 217 μ) gemessen wurde. Für die quantitative Bestimmung ist die Kenntnis der Natur des Aglykons und seine Extinktionshöhe Voraussetzung.

Der bei der Spaltung mit Säure entstandene Zucker wurde auch hier papierchromatographisch als Glucose ermittelt, die mit dem Carbazol-Verfahren (siehe dieses) auch quantitativ bestimmt werden konnte. Es wurden in den beiden oben genannten Ansätzen in der verbliebenen wäbr. Phase 0.43 bzw. 0.405 mg Glucose gefunden, entspr. 92.5 und 93.5% d. Th., auf $C_{39}H_{54}O_{15}$.

Digitalinum-verum-hexaacetat: Das aus der Chromatographie erhaltene Digitalinum-verum-hexaacetat schmolz nach dem Umkristallisieren aus Aceton-Äther bei 162–167°, wurde dann wieder fest, um ein zweites Mal bei 220–228° zu schmelzen; $[\alpha]_D^{20}$: –20°, ($c = 1.14$, Methanol). Dr. Schröder²²) fand bei den Kristallen einen ein-

²⁰) A. Zaffaroni, R. B. Burton u. E. H. Keutmann, Science [New York] 111, 6 [1950].

²¹) Fermentpräparat aus *Aspergillus oryzae* der Farbwerke Hoechst.

²²) Wir danken Hrn. Dr. Schröder, Hamburg, auch an dieser Stelle vielmals für seine Untersuchungen.

heitlichen n_{α} -Wert parallel zur Längsachse, $n_{\alpha} = 1.515$, und $n_{\gamma} = 1.516$; die gleichen Befunde ergab auch authentisches Digitalinum-verum-hexaacetat.

$C_{38}H_{68}O_{20}$ (965.0) Ber. C 59.73 H 7.12 OCH_3 3.25 Gef. C 59.71 H 7.22 OCH_3 3.90

Der R_F -Wert in Benzin-Benzol wurde zu 0.10, bei mit Formamid getränktem Papier mit Benzol zu 0.79 bestimmt, entspr. den Werten mit authentischem Digitalinum-verum-hexaacetat. Ebenso standen die papierchromatographisch charakterisierten Zucker (R_F -Wert für Glucose 0.18 und für Digitalose 0.52²³⁾) damit in Übereinstimmung.

Bei der Hydrolyse des Acetats mit Natriumhydrogencarbonat in der beim Gitorin beschriebenen Weise entstand Digitalinumverum vom Schmp. 240° (aus Methanol), $[\alpha]_D^{20}$: -1° ($c = 1.00$, Methanol); Nadeln aus Methanol.

$C_{38}H_{68}O_{15}$ (754.0) Ber. C 60.41 H 7.74 Gef. C 60.25 H 7.85

Isolierung des Gitoxigenins: Die Mutterlaugen des Gemisches Gitorin-16-Acetyl-digitalinumverum aus den Kammern 14–22 der Verteilung III wurden in Aceton gelöst und an Aluminiumoxyd chromatographiert. Aus den ersten durchgelaufenen Fraktionen, die nach dem Abdampfen des Acetons als Öl anfielen, schied sich Gitoxigenin in Kristallen aus; es zeigte den Schmp. 223–226°. Analyse und optische Drehung bestätigten, daß Gitoxigenin vorlag; Ausb. aus den 1.250 kg Droge etwa 2.0 g. Aus den weiteren Fraktionen, die auf Zusatz von steigenden Mengen Methanol zum Aceton eluiert wurden, ließ sich noch ein weiterer Anteil Gitorin-Gemisch isolieren.

Sämtliche Mutterlaugen und auch der Inhalt der Kammern 10–14 wurden in der üblichen Weise mit Essigsäureanhydrid und Pyridin acetyliert und an Aluminiumoxyd in der bei der Auftrennung des Gitoringemisches beschriebenen Weise chromatographiert. Hierbei konnten weitere Mengen Digitalinum-verum-hexaacetat isoliert werden, so daß sich die Gesamtausbeute daran aus der eingesetzten Drogenmenge auf etwa 5 g stellte.

Zucker-Bestimmung mit Carbazol

Die nach der Glykosid-Spaltung angefallene schwefelsaure Zucker-Lösung wurde in einem Meßkölbchen auf 10 ccm gebracht. 1 ccm dieser Lösung wurde in einem Reagensglas unter Wasserkühlung mit 2.0 ccm reiner konz. Schwefelsäure vorsichtig unterschichtet und durch Umrühren mit einem Thermometer so gemischt, daß die Temperatur nicht über 30° anstieg. Die Mischung wurde nunmehr 30 Min. bis 1 Stde. stehengelassen und dann mit 3 Tropfen einer 0.5-proz. Lösung von reinem Carbazol (Merck) in reinem Äthanol versetzt und umgeschüttelt. Dieser Ansatz wurde in doppelter Ausführung durchgeführt. Gleichzeitig wurde, ebenfalls in doppeltem Ansatz, eine Glucose-Lösung mit 0.030 mg/ccm und ein Versuch ohne Zucker in gleicher Weise mit Carbazol hergestellt. Alle 5 Lösungen wurden gleichzeitig in ein siedendes Wasserbad getaucht, nach 2 Minuten zusammen herausgenommen und nochmals durchgemischt. Anschließend wurden sie noch 13 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Danach wurden alle unter fließendem Wasser abgekühlt und sofort im Spektrophotometer gemessen.

Die Farbintensität war über Stunden konstant und ihre Abhängigkeit von der Konzentration streng linear, wie für Glucose, Galaktose, Rhamnose, Digitoxose, Ribose und Xylose ermittelt wurde. Daher ist es möglich, die Extinktionen der Vergleichs-Lösungen bei den entsprechenden Maxima der Absorption zu der Intensität der unbekanntes Zucker-Lösung in Beziehung zu setzen. Die Genauigkeit bei der gegenüber Holzman¹⁵⁾ etwas veränderten Methodik lag unterhalb 2%. Die Spektren (siehe theoret. Teil) wurden im Bereich von 320 bis 400 $m\mu$ im Abstand von 20 zu 20 $m\mu$ und zwischen 400 $m\mu$ und 650 $m\mu$ von 25 zu 25 $m\mu$ aufgenommen; im Maximum wurde von 5 zu 5 $m\mu$ gemessen. Eine Bestimmung zweier Zucker nebeneinander war nur dann möglich, wenn diese verschiedenen Gruppen angehörten, wie es oft bei Zuckergemischen aus der Hydrolyse von Herzgiften der Fall ist. Verschiedene Hexosen oder Pentosen im Gemisch ließen sich nicht gleichzeitig bestimmen. Die gebildete Färbung war bei Glucose ein reines Violett, wenn

²³⁾ Wir danken Hrn. Prof. Dr. T. Reichstein, auch an dieser Stelle, für die Überlassung einer Probe Digitalose.

man 66-proz. Säure verwendete, bei höherer Säure-Konzentration verschob sich die Färbung nach Rot hin. Bei einer 50-proz. Schwefelsäure-Konzentration wanderte die Farbe mehr nach Blau und die Farbintensität nahm erheblich ab. Deshalb wurde die 66-proz. Säure als besonders günstig verwendet. Die Erhöhung der Carbazol-Konzentration hatte eine geringe Verstärkung der Intensität zur Folge. Da das Carbazol in dem gemessenen Bereich in der vorliegenden Konzentration einen gewissen Anteil zur Absorption beiträgt, ist eine genaue Dosierung erforderlich, um dieses Spektrum im Blindwert herauskompen­sieren zu können. Wurde das Carbazol bei der Bildung des Farbstoffes mit der Schwefel­säure zugegeben, so entstanden stark streuende Werte, auch wenn die Mischungstempe­ratur genau innegehalten wurde. Die Ursache ist wohl in dem komplizierten Verhalten der Zucker bei der Umsetzung unter den gewählten Bedingungen zu suchen. Es empfiehlt sich deshalb bei jeder Bestimmung gleichzeitig eine Zucker-Lösung von bekanntem Ge­halt mitzubestimmen, da die Extinktionshöhen nicht völlig konstant sind und bei ver­schiedenen Versuchsreihen Unterschiede auftreten, während innerhalb einer Reihe die Werte gleichbleiben. Daher können auch für die einzelnen Zucker keine absoluten Ex­ tinktionshöhen (z. B. als molare Größen) angegeben werden.

Quantitative Bestimmung von binären Zuckergemischen

Beispiel: Glucose und Digitoxose. Hierzu wurde nach der Gleichung $3.0x - 8.0y = \log I_0/I$ (bei 475 $m\mu$) bzw. $6.8x - 5.4y = \log I_0/I$ (bei 550 $m\mu$) die Konzentration x von Glucose und y von Digitoxose bestimmt. Die angegebenen Koeffizienten ergeben sich aus dem $\log I_0/I$ (Ordinate) bei der Konzentration 1 der reinen Komponente (siehe die Kurven im theoret. Teil).

Bei der eingewogenen Konzentration von 0.0246 g/l Digitoxose und 0.015 g/l Glucose wurden 0.026 g/l bzw. 0.016 g/l wiedergefunden.

Sämtliche Schmelzpunkte wurden mit dem Apparat nach Kofler ermittelt; die Spek­ tren wurden mit dem Beckman-Spektrometer DUV bestimmt.

167. Helmut Zahn und Hans Wilhelm: Über einige Di-ester von Diolen mit Hippursäure und Benzoylalanin*)

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg]

(Eingegangen am 8. Mai 1952)

α,ω -Dihalogen-Derivate von Kohlenwasserstoffen und Aceton set­ zen sich mit den Kaliumsalzen der Hippursäure und des Benzoylala­ nins bei höherer Temperatur unter Druck zu Di-estern um.

Eine der wichtigsten chemischen Veränderungen von Faserkeratinen (Wolle, Haare usw.) besteht in der schonenden Reduktion von eingebauten Cystin­ Resten mit Salzen der Thioglykolsäure und der anschließenden Verknüpfung der gebildeten Sulfhydrylgruppen des SH-Keratins mit Dihalogen-Derivaten von Kohlenwasserstoffen¹⁾. Ein Teil der alkalilabilen Disulfid-Gruppen der im Keratin eingebauten Cystin-Reste wird hierbei durch stabile Cystein-bis­ thioäther-Gruppen ersetzt. Die Alkalilöslichkeit der modifizierten Wolle nimmt auf etwa die Hälfte ab. Einige Bis-thioäther des Cysteins wurden kürz­ lich²⁾ synthetisiert und aus nach Harris modifizierter Wolle in kristalliner Form isoliert.

*) Teil der Diplomarbeit von H. Wilhelm, Heidelberg 1950.

¹⁾ W. I. Patterson, W. B. Geiger, L. R. Mizell u. M. Harris, Journ. Res. nat. Bur. Standards 27, 89 [1941].

²⁾ J. A. Schikanowa, J. angew. Chem. (USSR) 23, 667 [1950] (C. 1951 I, 1546).