

chlorid, Sdp. 78–79°;  $n_D^{20}$  1.4014, ab. Verunreinigungen durch Oxalylchlorid wurden durch Waschen mit Wasser entfernt. Bei der Destillation des Kolbenrückstands wurden 37 g (0.16 Mol; 78% d. Th.) *Dichlor-n-butyloxy-acetylchlorid* (XII b) vom Sdp.<sub>12</sub> 95–98°;  $n_D^{25}$  1.4477, erhalten; auf seine Reindarstellung wurde verzichtet.

Aus 18 g (0.08 Mol) XII b wurden mit Natriumbutylat-Lösung, dargestellt aus 9.2 g (0.4 Mol) Natrium und 150 ccm n-Butanol, nach 4 stdg. Erhitzen 22 g (82.7% d. Th.) *Tri-n-butyloxy-essigsäure-n-butylester*, Sdp.<sub>0.05</sub> 107°;  $n_D^{20}$  1.4300, erhalten.

$C_{18}H_{36}O_5$  (332.2) Ber. C 65.06 H 10.87 Gef. C 65.19 H 10.87

Das Säurechlorid lieferte ferner nach vollständiger Alkoholyse mit Hydrazinhydrat Oxal-säure-dihydrazid, Schmp. 235°, und mit Ammoniak Oxamid, Schmp. 417° (Zers.).

## ERICH HAACK, MARIANNE GUBE, FRITZ KAISER und HELMUT SPINGLER

### Über die Isolierung von Glucogitaloxin aus den Blättern von *Digitalis purpurea*\*)

Aus den Forschungslaboratorien der C. F. Boehringer & Soehne G. m. b. H.,  
Mannheim-Waldhof

(Eingegangen am 14. Mai 1958)

Glucogitaloxin = 16-Formyl-purpureaglykosid B wurde aus den Äthanol-extrakten von bei der Ernte mit Trockeneis eingefrorenen Blättern der *Digitalis purpurea* durch Chromatographie an Silicagel isoliert.

In unseren früheren Mitteilungen<sup>1,2)</sup> über Gitaloxin und die genuinen Glykoside der *Digitalis purpurea* konnten wir bereits berichten, daß das in Extrakten von unfermentierten *Digitalis-purpurea*-Blättern zu erwartende „genuine Glykosid“ des Gitaloxins, das Glucogitaloxin, tatsächlich existiert. Ohne das Glykosid im präparativen Maßstab isoliert zu haben, gelang die praktisch vollständige Aufklärung seiner Konstitution nach einer Methode, wie sie neuerdings bei der Untersuchung von Naturstoffgemischen immer häufiger angewendet wird: Man stellt eine größere Anzahl von Papierchromatogrammen des Extraktes her, eluiert bei jedem einzelnen den fraglichen Substanzfleck und führt mit dem Eluat spezifische Nachweisreaktionen aus.

Auf diese Weise gelang uns der Nachweis, daß das untersuchte Glykosid die Zusammensetzung 16-Formyl-gitoxigenin-(Digitoxose)<sub>3</sub>-Glucose (I) besitzt.

Wenn auch dieses Verfahren für die schnelle Aufklärung einzelner schwer zugänglicher Komponenten von Naturstoffgemischen einen beträchtlichen Wert besitzt, so

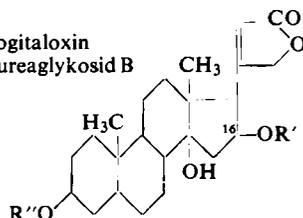
\*) 12. Mitteil. über Herzglykoside.

1) E. HAACK, F. KAISER und H. SPINGLER, Chem. Ber. **89**, 1353 [1956].

2) E. HAACK, F. KAISER, M. GUBE und H. SPINGLER, Naturwissenschaften **43**, 301 [1956].

wird man es doch in den meisten Fällen als unerlässlich erachten, eine Substanz wenigstens in so großer Menge in reiner Form zu isolieren, daß Analysen und einwandfreier Konstitutionsbeweis durchgeführt werden können.

- I: R' = CHO, R'' = 3 Digitoxosen + 1 Glucose = Glucogitaloxin  
 II: R' = H, R'' = 3 Digitoxosen + 1 Glucose = Purpureaglykosid B  
 III: R' = CHO, R'' = 3 Digitoxosen = Gitaloxin  
 IV: R' = H, R'' = 3 Digitoxosen = Gitoxin  
 V: R' = CHO, R'' = H = Gitaloxigenin  
 VI: R' = H, R'' = H = Gitoxigenin



Zur Isolierung des Glucogitaloxins empfiehlt es sich nicht, von getrockneten Blättern auszugehen, weil bereits beim Trocknen, je nach den Bedingungen, durch fermentative Abspaltung von Glucose ein mehr oder weniger großer Teil des vorhandenen Glucogitaloxins zu Gitaloxin abgebaut wird und man somit von vornherein einen unnötigen Verlust in Kauf nehmen müßte. Wir haben die Fermentation durch direkt bei der Ernte erfolgendes Einfrieren der Blätter mit Trockeneis und anschließende Extraktion mit Äthanol ausgeschaltet. Der dann vom Chlorophyll befreite Extrakt enthielt Glucogitaloxin so weit angereichert, daß eine Aufarbeitung erfolgversprechend erschien.

Eine zweite, weit größere Schwierigkeit, die sich auch während des ganzen Trennungsgangs nie beseitigen ließ, bereitete die Labilität der Formylgruppe, welche sich beim Glucogitaloxin noch weit größer erwies als uns das vom Gitaloxin her bekannt war. In Lösung trat meist recht bald eine Abspaltung von Ameisensäure ein, besonders wenn im wäßrigen Medium gearbeitet wurde. Praktisch unbrauchbar war Methanol, und bereits geringe Methanolzusätze zu anderen Lösungsmitteln bewirkten einen erheblichen Abbau zu Purpureaglykosid B.

Eine Auftrennung des Substanzgemisches nach der sonst geübten Verteilungschromatographie an Cellulosepulver-Säulen war wegen der zu langen Dauer des Vorganges kaum möglich. Zum Ziel führte dagegen die Chromatographie an Silicagel, wie sie von A. STOLL und Mitarbb.<sup>3)</sup> für die Trennung von Digitalisglykosiden eingeführt wurde. Bei der Wahl der Lösungsmittel haben wir dann weitgehend auf die besonderen Eigenschaften des empfindlichen Glucogitaloxins Rücksicht genommen. Zur ersten groben Auftrennung des Extraktes verwendeten wir trockenes Silicagel<sup>3)</sup> und als Eluationsmittel Gemische von Chloroform und Äthanol. Dabei konnten schon Fraktionen erhalten werden, die Glucogitaloxin + Purpureaglykosid A angereichert enthielten. Die zur Trockne gebrachten Fraktionen wurden in Aceton gelöst, mit Äther gefällt und ein zweites Mal mit Chloroform/Äthanol-Gemischen chromatographisch zerlegt. Die Fraktionen, in denen nun Glucogitaloxin + Purpureaglykosid A angereichert waren, enthielten außer etwas Purpureaglykosid B nur noch wenig sonstige Ballaststoffe.

Im Verlaufe dieser ersten Trennungen zeigte sich, daß die endgültige Auftrennung dieser beiden in ihren Löslichkeitseigenschaften so sehr ähnlichen Glykoside mit nur

<sup>3)</sup> A. STOLL, E. ANGLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL und J. RENZ, *Helv. chim. Acta* **34**, 1460 [1951].

einem Säulendurchgang unter Anwendung eines Lösungsmittelgemisches nicht zu erreichen sein würde.

Nach vielerlei Versuchen gelang es dann, an wassergesättigtem Silicagel mit Benzol/Isopropylalkohol (9:1) wenigstens einen Teil des Purpureaglykosids A abzutrennen. Mit Benzol/Isopropylalkohol (85:15) erhielten wir Mischfraktionen, und bei wiederholter Chromatographie wurde der Anteil der Purpureaglykosid A-Fraktion immer kleiner, wobei sich die Zusammensetzung der Mischfraktion kaum mehr änderte.

Schließlich gelang die Trennung der beiden Komponenten durch Chromatographie an Silicagel, das mit der wäßrig-alkoholischen Phase des Lösungsmittelgemisches Trichloräthylen/Äthanol/Wasser (2:1:1) gesättigt worden war. Dabei war aber auch ein immer noch recht beträchtlicher Verlust an Glucogitaloxin nicht zu vermeiden. Die so erhaltenen Glucogitaloxin-Fractionen enthielten nur noch Spuren von Purpureaglykosid A und wenig Purpureaglykosid B. Letzteres konnte durch Chromatographie an trockenem Silicagel mit Chloroform/Äthanol-Gemisch völlig abgetrennt werden.

Proben des Glucogitaloxins zeigten keine Neigung zur Kristallisation. Wir haben daher die Substanz mehrfach in Isopropylalkohol gelöst und mit Äther ausgefällt, da wir das Risiko, durch längeres Stehenlassen in Lösung schließlich doch wieder ein Gemisch von Purpureaglykosid B und Glucogitaloxin zu erhalten, nicht eingehen wollten.

Der Beweis für die Konstitution I wurde durch folgende Versuchsergebnisse erbracht:

Bei Behandlung des Glucogitaloxins mit verd. Ammoniak<sup>1)</sup> oder mit wäßrig-methanolischer Bleiacetatlösung entstand Purpureaglykosid B (II). Beide Reaktionen, insbesondere die mit Bleiacetat nach D. KUTTER<sup>4)</sup>, sind beweisend dafür, daß es sich bei dem abgespaltenen Acylrest um Ameisensäure handelt. Nach Umesterung zum Methylester konnte der Säurerest des Glucogitaloxins durch Gaschromatographie eindeutig als Ameisensäure identifiziert und quantitativ bestimmt werden.

Das IR-Spektrum des Glucogitaloxins unterscheidet sich von dem des Purpureaglykosids B, wie zu erwarten, nur sehr wenig. Die Anwesenheit der Formylgruppe macht sich in einer Verbreiterung der durch den Lactonring verursachten CO-Bande in Richtung größerer Wellenlängen und in einer Schulter zwischen 5.75 und 5.80  $\mu$  bemerkbar.

Durch fermentative Abspaltung der Glucose mittels Strophanthobiase entstand Gitaloxin (III). Bei schonender saurer Hydrolyse mit sehr verdünnter Salzsäure in Aceton<sup>1)</sup> war neben den zuckerärmeren Abbauprodukten und Gitoxigenin (VI) das 16-Formyl-gitoxigenin = Gitaloxigenin (V) nachweisbar. Nach Behandlung mit verd. Salzsäure wurde im Hydrolysat Digitoxose und Digilanidobiose nachgewiesen.

Bei der Formylierung von Purpureaglykosid B mit Ameisensäure-essigsäureanhydrid in Pyridin wurde neben zahlreichen höher formylierten Produkten ein Monoformyl-purpureaglykosid B erhalten, dessen  $R_F$ -Wert mit dem von Glucogitaloxin identisch war.

<sup>4)</sup> Dissertat. Univ. Lausanne 1957.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

**Papierchromatographie:** Die bei den verschiedenen Trennungen an Silicagel erhaltenen Fraktionen sowie die zum Zwecke der Konstitutionsermittlung durchgeführten Nachweisreaktionen wurden papierchromatographisch nach der früher beschriebenen Methode<sup>5)</sup> überprüft. Zum Nachweis der genuinen Glykoside diente in der Regel das Lösungsmittelgemisch Chloroform/Tetrahydrofuran/Methylglykol/Formamid (30:45:1.5:9) und zum Nachweis der Sekundärglykoside und Aglykone das Gemisch Xylol/Methyläthylketon (1:1).

**Herstellung des Blattextraktes:** Im August wurden 40 kg *Digitalis-purpurea*-Blätter sofort bei der Ernte mit Trockeneis eingefroren und danach in einer eisernen Kugelmühle gemahlen. Der „Blattschnee“ wurde mit 100 l Äthanol so lange gerührt, bis die Lösung Zimmertemperatur erreicht hatte. Darauf wurde abgesaugt, der Blattrückstand nochmals mit 100 l Äthanol ausgerührt und wieder abgesaugt. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum-Umlaufverdampfer bei 20–25° auf 24 l konzentriert und das Konzentrat zur Abtrennung des Chlorophylls über Kieselgur abgesaugt. Das wäßrig-alkohol. Filtrat wurde zweimal mit einem Fünftel seines Volumens an Chloroform ausgeschüttelt, die wäßrige Phase verworfen und die Chloroformauszüge i. Vak. bis zur Sirupkonsistenz bei 50° Badtemperatur konzentriert. Dieser Sirup wurde in Chloroform/Äthanol (2:1) aufgenommen, der dabei ausflockende Niederschlag abgesaugt und verworfen. Das Filtrat konnte i. Vak. zur Trockne gebracht werden. In dem so erhaltenen hellbraunen Schaum waren die genuinen Glykoside angereichert. Ausb., bezogen auf Trockenblatt, 1.2%.

**Chromatographie an trockenem Silicagel mit Chloroform/Äthanol-Gemischen:** Das verwendete Silicagel wurde nach der Vorschrift von A. STOLL und Mitarbb.<sup>3)</sup> dargestellt. Pro 1 g Substanz wurden 10 g Silicagel eingesetzt. Der Durchmesser der verwendeten Chromatographiesäulen (mit Hahn) richtete sich nach der eingesetzten Silicagelmenge. Als günstig erwies sich eine Füllhöhe von 15 cm.  $\frac{4}{5}$  der berechneten Silicagelmenge wurden mit Benzol in die Säule eingeschlämmt und mit schwachem Vakuum leicht angesaugt, so daß eine Schicht von 2 cm Benzol darüber stehen blieb. Mit dem letzten Fünftel an Silicagel wurde die Substanz trocken verrieben und dann, ebenfalls in Benzol angeschlämmt, auf die Säule gebracht.

Für die grobe Fraktionierung des Extraktes wählten wir Säulen mit einem Durchmesser von 7 cm. Daran konnten 15 g Extrakt fraktioniert werden. Die Ablaufgeschwindigkeit war so reguliert, daß pro Min. 50 ccm Lösung abflossen.

## Beispiel 1. Chromatographie von 15 g Extrakt

Fraktion	Lösungsmittel	Liter	Trockenrückstand		
			g	Bestandteile	
1	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (96:4)	3	2.31	} Ballaststoffe, unbek. Digitoxigeninglykosid, $R_F = 0.88$ , Verodoxin, Strosposid	
2	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (92:8)	1.5	0.86		
3	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (92:8)	0.5	0.39		
4	} HF <sub>1</sub>	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (92:8)	1	1.19	} <i>Purpureaglykosid A</i> , <i>Glucogitalo cin</i> , (Purp.-glyk. B), Glucoverodoxin, Ballaststoffe
5		CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (92:8)	1	1.13	
6		CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (88:12)	0.5	0.60	
7	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (88:12)	1	1.98	} Purp.-glyk. B, (Glucoverodoxin), Digitalinum verum, Ballaststoffe (u. a. Saponine)	
8	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (76:24)	0.5	0.83		
9	Äthanol	1.5	5.07		

<sup>5)</sup> F. KAISER, Chem. Ber. 88, 556 [1955].

Die Fraktionen 4, 5 und 6 wurden vereinigt (Hauptfraktion 1 = HF<sub>1</sub>), in Aceton gelöst, mit Äther gefällt und anschließend an einer Säule der gleichen Dimension und mit den gleichen Lösungsmittelgemischen wie bei Beispiel 1 aufgetrennt (siehe Beispiel 2).

**Beispiel 2. Chromatographie von 15 g HF<sub>1</sub>**

Fraktion	Lösungsmittel	Liter	Trockenrückstand g	Bestandteile
1	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (96:4)	3	1.75	Ballaststoffe
2-4 = HF <sub>2</sub>	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (92:8)	4	8.84	{ Purp.-glyk. A, Glucogitaloxin, Purp.-glyk. B, wenig Ballaststoffe wenig Purp.-glyk. B, wenig Glucogitaloxin, Ballaststoffe, Glucoverodoxin
5-7	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (92:8)	2	1.80	
8	CHCl <sub>3</sub> -Äthanol (76:24)	0.5	2.18	
9	Äthanol	1	0.20	

*Chromatographie an wassergesättigtem Silicagel mit Benzol/Isopropylalkohol-Gemischen:* Das Silicagel wurde im Verhältnis 2:3 innig mit Wasser verrührt. Je g Substanz wurden 100 g gesättigtes Silicagel eingesetzt. Den Durchmesser der Säule wählten wir so, daß die Füllhöhe 17 cm betrug. <sup>4</sup>/<sub>5</sub> des Silicagels wurden unter leichtem Stampfen portionsweise in die Säule gefüllt. Mit dem letzten Fünftel wurde die Substanz verrieben, ebenfalls trocken eingefüllt und festgestampft. Die Benzol/Isopropylalkohol-Gemische wurden mit Wasser gesättigt.

**Beispiel 3. Chromatographie von 5 g HF<sub>2</sub> (Säulendurchmesser 7 cm)**

Fraktion	Lösungsmittel	Liter	Trockenrückstand g	Bestandteile
1	Benzol-Isopropylalkohol (90:10)	5	0.65	Purpureaglykosid A
2 = HF <sub>3</sub>	Benzol-Isopropylalkohol (85:15)	5	4.10	{ Purp.-glyk. A, Glucogitaloxin, Purpureaglykosid B Purp.-glyk. B, Ballaststoffe, Glucoverodoxin
3	Äthanol	2.5	0.25	

Aus 8.8 g HF<sub>2</sub> wurden nach zwei solchen Trennungen und einer Reinigungstrennung mit den gleichen Gemischen 6 g HF<sub>3</sub> erhalten.

*Chromatographie an mit wäßrig-alkoholischer Phase gesättigtem Silicagel:* Das Silicagel wurde mit der wäßrig-alkoholischen Phase aus dem Lösungsmittelgemisch Trichloräthylen/

**Beispiel 4. Chromatographie von 3 g HF<sub>3</sub> (Säulendurchmesser 7 cm)**

Fraktion	Lösungsmittel	Liter	Trockenrückstand g	Bestandteile
1	Trichloräthylenphase	2.5	0.36	Ballaststoffe
2 + 3	Trichloräthylenphase	5	0.62	Purpureaglykosid A
4	Trichloräthylenphase	2.5	0.45	Purp.-glyk. A + Glucogitaloxin
5 + 6 = HF <sub>4</sub>	Trichloräthylenphase	5	0.97	{ Glucogitaloxin, (wenig Purp.-glyk. A, wenig Purp.-glyk. B)
7 + 8	Trichloräthylenphase	5	0.51	
9	Äthanol	2.5	0.08	Ballaststoffe

Äthanol/Wasser (2:1:1) im Verhältnis 2:3 verrührt. Für 1 g Substanz wurden 200 g gesättigtes Silicagel eingesetzt. Der Säulendurchmesser wurde so gewählt, daß die Füllhöhe 20 cm betrug. Als mobile Phase diente die Trichloräthylenphase.

Aus 6 g HF<sub>3</sub> wurden nach zwei solchen Trennungen 1.9 g weitgehend gereinigtes Glucogitaloxin HF<sub>4</sub> erhalten, aus dem nach einer weiteren Trennung gleicher Art und nach einer Reinigungstrennung mit dem Chloroform/Äthanol-Gemisch nach Beispiel 1 ein Produkt resultierte, das nach zweimaligem Umfällen mit Isopropylalkohol/Äther analysenrein anfiel.

Die lufttrockene Substanz hatte 2 Moll. Wasser gebunden, auf dessen Entfernung durch ausreichendes Trocknen wir wegen der Gefahr der Formylabspaltung verzichteten.

*Glucogitaloxin*: Schmp. 226–230°,  $\lambda_{\max}$  217 m $\mu$  (log  $\epsilon$  = 4.20).

C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>O<sub>20</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (1007.1) Ber. C 57.24 H 7.81 CHO 2.88

Gef. C 57.37 H 7.90 CHO 2.41

*Fermentative Spaltung mit Strophanthobiase*: Das Enzympräparat wurde aus *Strophanthus-kombé*-Samen nach der Vorschrift von J. SCHMUTZ und T. REICHSTEIN<sup>6)</sup> hergestellt. Zur Fermentation lösten wir 20 mg mit 0.16 ccm Dimethylformamid befeuchtetes Glucogitaloxin in 12 ccm Wasser, versetzten mit 300 mg Strophanthobiase und schüttelten die Suspension 48 Stdn. bei 36°. Eine nach 4 Stdn. genommene Probe und die Lösung nach 48 Stdn. wurden einzeln i. Vak. zur Trockne gebracht, mehrmals mit Chloroform ausgezogen und die Rückstände der wieder eingeengten Chloroformlösungen papierchromatographiert. Bereits nach 4 Stdn. war Gitaloxin neben etwas Purpureaglykosid B und Gitoxin entstanden. Die Hauptmenge bestand aus noch nicht umgesetztem Glucogitaloxin. Nach 48 Stdn. waren nur noch Spuren von Glucogitaloxin vorhanden, aber neben Gitaloxin war bereits zu mindestens 50 % Gitoxin entstanden.

*Abspaltung der Ameisensäure mit Bleiacetat*<sup>4)</sup>: 10 mg Glucogitaloxin wurden in 1 ccm Methanol gelöst, mit 1 ccm 5-proz. wäßriger Bleiacetatlösung versetzt und 12 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Lösung wurde dann mit 8 ccm Wasser verdünnt und viermal mit je 2 ccm Chloroform/Äthanol (2:1) ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen wurden i. Vak. zur Trockne gebracht. Die Papierchromatogramme des Rückstandes zeigten die Anwesenheit von Purpureaglykosid B.

*Formylierung von Purpureaglykosid B*: 30 mg Purpureaglykosid B wurden in 1.5 ccm Pyridin gelöst, mit 0.1 ccm Ameisensäure-essigsäure-anhydrid versetzt und bei 20° stehengelassen. Je 1/3 der Lösung wurde nach 1, 2 und 3 Stdn. mit 5 ccm Wasser versetzt und dreimal mit je 1 ccm Chloroform/Äthanol (2:1) ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden i. Vak. zur Trockne gebracht. Die Papierchromatogramme der drei Rückstände zeigten die Anwesenheit von Glucogitaloxin, dessen Menge von 1 nach 3 Stdn. zugunsten höher formylierter Produkte abnahm.

*Gaschromatographische Identifizierung und quantitative Bestimmung der Formylgruppe*: 5 bis 8 mg Substanz wurden zusammen mit 20 mg *p*-Toluolsulfonsäure in 0.3 ccm Methanol gelöst. Die Lösung wurde zur Umesterung 30 Min. unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde ca. 0.1 ccm in eine auf ca. –15° gekühlte gradierte Vorlage destilliert. Von dem Destillat wurden 0.02 ccm in den Gaschromatographen<sup>\*)</sup> eingespritzt.

Der Nachweis des gebildeten Ameisensäure-methylesters ist einwandfrei. Die quantitative Auswertung erfolgt in üblicher Weise mittels der Bandenfläche. Als Nebenprodukt der Umesterung tritt Dimethyläther auf. Ferner erscheinen bei Anwesenheit von Digitoxose in der untersuchten Substanz immer zwei niedrige, aber charakteristische Zacken.

Über die Einzelheiten der Methode soll an anderer Stelle berichtet werden.

\*) Fraktometer 154 B, Bodenseewerk Perkin Elmer.

6) *Pharmac. Acta Helvetiae* 22, 359 [1947].