

## 136. Die Kristallisation der Desacetyl-lanatoside A und B (Purpureaglykoside A und B).

37. Mitteilung über Herzglykoside<sup>1)</sup>

von A. Stoll, W. Kreis und A. von Wartburg.

(24. IV. 54.)

Die genuinen Glykoside der *Digitalis lanata Ehrh.*, die Lanatoside A, B und C<sup>2)</sup>, die in ihrem Zuckerrest eine Acetylgruppe tragen, gehen durch milde Alkalieinwirkung in Desacetylverbindungen über<sup>3)</sup>, von welchen diejenige der C-Komponente leicht kristallisiert werden kann. Die acetylfreien Produkte, die sich von den Lanatosiden A und B ableiten, erwiesen sich mit den Purpureaglykosiden A und B<sup>4)</sup>, den genuinen Glykosiden der *Digitalis purpurea L.*, als identisch. Sie sind bisher unabhängig von der Art ihrer Herstellung – sei es entweder aus den Lanatosiden durch Desacetylierung oder als solche vorgebildet aus der Purpurea-Droge – nur als amorphe Präparate erhalten worden, auch wenn sie sich als analysenrein und auf Grund von Spaltungsreaktionen als einheitlich erwiesen haben.

Angeregt durch neuere Fortschritte, die wir bei der Reinigung von Herzglykosiden mit Hilfe von verfeinerten Verteilungsverfahren oder bei der Chromatographie an verschiedenen Trägern, wie z. B. Diatomitstein und Silicagel, erzielt haben, versuchten wir erneut, die bisher amorphen Desacetyl-lanatoside zu kristallisieren. Wir verwendeten Lanatosidpräparate, die sehr sorgfältig von den letzten Anteilen schwer abzutrennender Begleitglykoside befreit waren, und erhielten nach möglichst schonender Abspaltung des Acetylrestes Präparate, die sich nach weiteren Reinigungsoperationen, wenn auch auf umständliche und verlustreiche Art, einwandfrei kristallisieren liessen. Durch die Übertragung der mit den Desacetylierungsprodukten gemachten Erfahrungen auf die Reinigung der genuinen Glykoside der *Digitalis purpurea* gelang es dann auch, diese von Natur aus acetylfreien Glykoside zu kristallisieren und so die Purpureaglykoside A und B erstmals in kristallisierter Form darzustellen. Da die Überführung der vorerst stets amorph anfallenden Präparate in die kristallisierten Verbindungen jedoch mit ziemlich hohen Materialverlusten verbunden und daher eine Fraktionierung oder Veränderung der Präparate a priori nicht ganz von der Hand zu weisen war, schien

<sup>1)</sup> 36. Mitteilung, Helv. **36**, 1565 (1953).

<sup>2)</sup> A. Stoll & W. Kreis, Helv. **16**, 1049 (1933).

<sup>3)</sup> A. Stoll & W. Kreis, Helv. **16**, 1390 (1933).

<sup>4)</sup> A. Stoll & W. Kreis, Helv. **18**, 120 (1935).

es uns notwendig, nicht nur die Eigenschaften der Substanzen nochmals zu überprüfen, sondern damit auch einige Abbaureaktionen durchzuführen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen berechtigen zum Schluss, dass die jetzt kristallisierbaren Verbindungen identisch sind mit den bisher als amorph beschriebenen Desacetyl-lanatosiden A und B bzw. den damit identischen Purpureaglykosiden A und B.

Die Darstellung von so einheitlichen Lanatosiden A und B, wie sie für die Kristallisation der acetylfreien Verbindungen notwendig sind, gelingt durch Verteilen zwischen Wasser und mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln<sup>1)</sup> oder durch Chromatographie<sup>2)</sup>. Ein von Begleitglykosiden<sup>3)</sup> praktisch freies Lanatosid A konnte z. B. durch zweimaliges Chromatographieren an Magnesiumsilicat-Celit-Säulen<sup>4)</sup> gewonnen werden. Der in einem solchen Präparat durch Chromatographie an Silicagel<sup>5)</sup> oder durch Verteilungsanalyse<sup>6)</sup> noch nachweisbare Gehalt an Lanatosid B lag unter 0,5%. Wurde die Acetylgruppe nun auf sehr schonende Art abgespalten, z. B. mit Kaliumhydrogencarbonat<sup>7)</sup> in wässrigem Methanol, so erhielt man das entstandene Desacetyl-lanatosid A als weisses, amorphes, in Alkohol schwer lösliches Pulver, das sich aus Dioxan-Äther in stacheligen, kugeligen Aggregaten abschied. Dieses Präparat wurde nun noch einer Chromatographie an Silicagel unterworfen. Die Spitzenfraktionen des Maximums im Chromatogramm kristallisierten aus Methanol-Essigester oder abs. Alkohol-Äther-Gemischen. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus abs. Alkohol-Äther (1:1) wurden die in Fig. 1 abgebildeten, dünnen, unregelmässig zu Rosetten angeordneten, schräg abgeschnittenen länglichen Blättchen erhalten. In etwas derberen Formen kristallisiert Desacetyl-lanatosid A aus Chloroform-Methanol-Äther (Fig. 2).

Zu Präparaten, die sich in jeder Beziehung analog verhielten, gelangten wir durch Fraktionierung und Reinigung des genuinen Glykosides aus der *Digitalis purpurea* (Fig. 3). Die nach den früheren Angaben<sup>8)</sup> hergestellten Rohpräparate wurden an mit Diatomitstein

<sup>1)</sup> Von *A. Stoll & W. Kreis*, *Helv.* **16**, 1049 (1933), ist die Verteilung zwischen Methanol-Chloroform-Wasser durchgeführt worden.

<sup>2)</sup> Über grössere Säulenanlagen mit Diatomitsteinfüllung zur Trennung von Meerzwiebelglykosiden haben wir in der Arbeit von *A. Stoll & W. Kreis*, *Helv.* **34**, 1431 (1951), eingehend berichtet.

<sup>3)</sup> Es handelt sich hauptsächlich um die Abtrennung der beigemischten Lanatoside B und C.

<sup>4)</sup> *K. Dobriner, S. Liebermann & C. P. Rhoads*, *J. Biol. Chem.* **172**, 241 (1948); *A. Aebi & T. Reichstein*, *Helv.* **33**, 1013 (1950).

<sup>5)</sup> *A. Stoll, E. Angliker, F. Barfuss, W. Kussmaul & J. Renz*, *Helv.* **34**, 1460 (1951).

<sup>6)</sup> Wird das Präparat zwischen Wasser-Methanol-Chloroform verteilt, so reichert sich das Lanatosid B in der Wasserphase an. Durch wiederholte Verteilung können Beimengungen von ca. 0,5% Lanatosid B mit Hilfe der *Keller-Kiliani*-Farbreaktion (rote Zone an der Trennfläche Eisessig-Schwefelsäure) noch gut nachgewiesen werden.

<sup>7)</sup> *H. Rosenmund & T. Reichstein*, *Pharm. acta Helv.* **17**, 176 (1942).

<sup>8)</sup> *A. Stoll & W. Kreis*, *Helv.* **18**, 120 (1935).

gefüllten Säulen<sup>1)</sup> mehrmals fraktioniert, worauf sich dann wiederum die Spitzenfraktionen kristallisieren liessen.

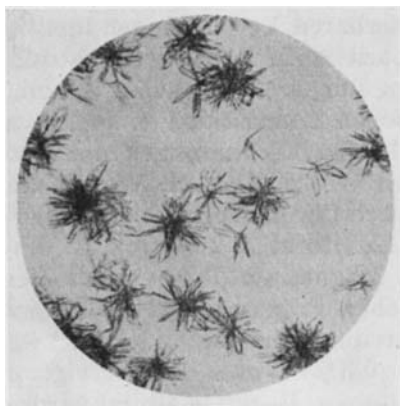


Fig. 1.  
Desacetyl-ianotosid A  
aus abs. Alkohol-Äther.



Fig. 2.  
Desacetyl-ianotosid A  
aus Chloroform-Methanol-Äther.

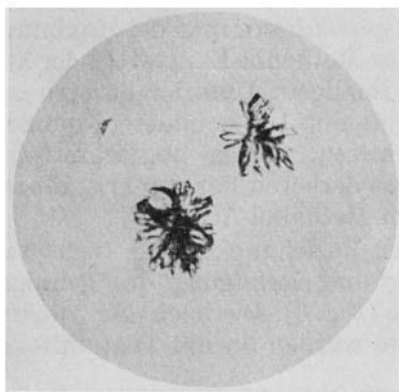


Fig. 3.  
Purpureaglykosid A  
aus abs. Alkohol-Äther.

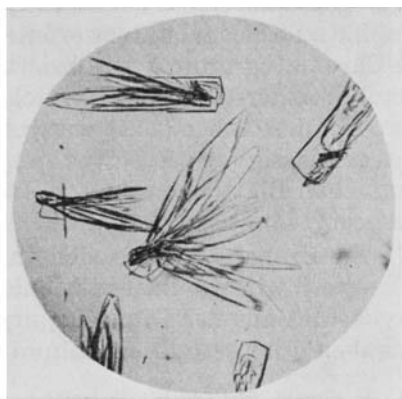


Fig. 4.  
Desacetyl-ianotosid B  
aus Chloroform-Methanol-Äther.

In der Tab. 1 sind einige Eigenschaften der kristallisierten Verbindung und der in der Literatur beschriebenen amorphen Präparate zusammengestellt.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, zeigen die Werte für die einzelnen Präparate innerhalb der Fehlergrenzen eine gute Übereinstimmung. Für die Reinheit und Einheitlichkeit von Digitalisglykosiden ist die Verteilungszahl, die bei diesen Präparaten in einem Wasser-Methanol-Chloroform-Gemisch bestimmt wurde, ein wichtiges Merk-

<sup>1)</sup> Vgl. A. Stoll & W. Kreis, *Helv.* **34**, 1431 (1951).

mal. Zur Ergänzung der Beschreibung geben wir in Fig. 5 auch das UV.-Spektrum der kristallisierten Verbindung wieder; in ihm ist lediglich das für den Lactonfünfring charakteristische Maximum bei 218 m $\mu$  (log  $\epsilon$  = 4,17) erkennbar.

**Tabelle 1.**

Physikalische Daten von Desacetyl-lanatosid A (Purpureaglykosid A).

|  | Zersetzungspunkt <sup>1)</sup>                 | $[\alpha]_D$   | Verteilungszahl <sup>2)</sup> |
|--|--|--|-------------------------------|
| Desacetyl-lanatosid A krist.                     | 275—280 <sup>0</sup>                           | + 10,8 <sup>0</sup> (A)<br>– 5,4 <sup>0</sup> (P)  | 87 $\pm$ 2                    |
| Desacetyl-lanatosid A amorph,<br>aus Lanatosid A | 255—258 <sup>0 3)</sup><br>267 <sup>0 4)</sup> | + 10,3 <sup>0</sup> (A) <sup>3)</sup><br>+ 12,2 <sup>0</sup> (A) <sup>4)</sup><br>– 5,2 <sup>0</sup> (P) | 87,5 $\pm$ 2 <sup>3)</sup>    |
| Purpureaglykosid A<br>aus Digitalis purpurea     | 268—270 <sup>0 4)</sup>                        | + 12,1 <sup>0</sup> (A) <sup>4)</sup>  | 88 $\pm$ 2 <sup>4)</sup>      |

A = 75-proz. Alkohol; P = Pyridin.

Zur weiteren Charakterisierung des kristallisierten Präparates haben wir die beiden folgenden Abbaureaktionen durchgeführt, nämlich die totale Hydrolyse mit Säuren und die partielle Spaltung mit dem Blattferment aus der Digitalis lanata. Erwartungsgemäss erhielten wir mit Säure Digitoxigenin und die beiden Spaltstücke aus der Zuckerkette, die Digilanidobiose und D-Digitoxose, enzymatisch Digitoxin und D-Glucose. Die Ergebnisse dieser Abbaureaktionen bestätigen demnach, dass das kristallisierte Produkt unverändertes Desacetyl-lanatosid A darstellt.

Ein für die Kristallisationsversuche geeignetes Desacetyl-lanatosid B wurde aus reinem Lanatosid B nach ähnlichen Methoden erhalten, wie wir sie für das Desacetyl-lanatosid A angegeben haben. Die durch fraktionierte Abscheidung aus abs. Alkohol erhaltenen schwerlöslichen Anteile oder Spitzenfraktionen von Chromatogrammen liessen sich aus Chloroform-Methanol-Äther-Gemischen kristallisieren. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus demselben Lösungsmittelgemisch, wobei bestimmte Bedingungen eingehalten werden mussten, gelangte man zu Präparaten ohne amorphe Beimengungen und mit konstanten Eigenschaften. Das Desacetyl-lanatosid B kristallisiert dann in länglichen, dünnen Prismen und Spiessen, wie sie in Fig. 4 abgebildet sind. Einige Eigenschaften der kristallisierten Verbindung

<sup>1)</sup> Die Zersetzungspunkte sind wenig charakteristisch. Die amorphen Verbindungen wurden vor der Bestimmung aus Methanol mit sehr verdünntem wässrigem Alkali gefällt; wird diese Umfällung in neutralem Medium (z. B. aus Alkohol-Wasser) durchgeführt, so liegen die Zersetzungspunkte um 20—40<sup>0</sup> tiefer.

<sup>2)</sup> Die Verteilungszahl wurde nach A. Stoll & W. Kreis, Helv. **18**, 124 (1935), bestimmt. Siehe auch exp. Teil der vorliegenden Arbeit.

<sup>3)</sup> A. Stoll & W. Kreis, Helv. **16**, 1397 (1933).

<sup>4)</sup> A. Stoll & W. Kreis, Helv. **18**, 134, 135 (1935).

sind in Tab. 2 mit den der Literatur entnommenen Daten für die amorphen Präparate zusammengestellt.

**Tabelle 2.**  
Physikalische Daten von Desacetyl-lanatosid B (Purpureaglykosid B).

|  | Zersetzungs-<br>punkt   | $[\alpha]_D$   | Verteilungs-<br>zahl <sup>1)</sup> |
|--|-------------------------|--|------------------------------------|
| Desacetyl-lanatosid B krist.                     | 240—242 <sup>0</sup>    | + 15,5 <sup>0</sup> ± 1,5 <sup>0</sup> (A)<br>+ 2,5 <sup>0</sup> (P) | 52 ± 2                             |
| Desacetyl-lanatosid B amorph,<br>aus Lanatosid B | 240 <sup>0 2)</sup>     | + 20,4 <sup>0</sup> (A) <sup>2)</sup>                                | 52 ± 2                             |
| Purpureaglykosid B<br>aus Digitalis purpurea     | 238—240 <sup>0 3)</sup> | + 20,4 <sup>0</sup> (A) <sup>3)</sup>                                | 52 ± 2 <sup>3)</sup>               |

A = 75-proz. Alkohol; P = Pyridin.

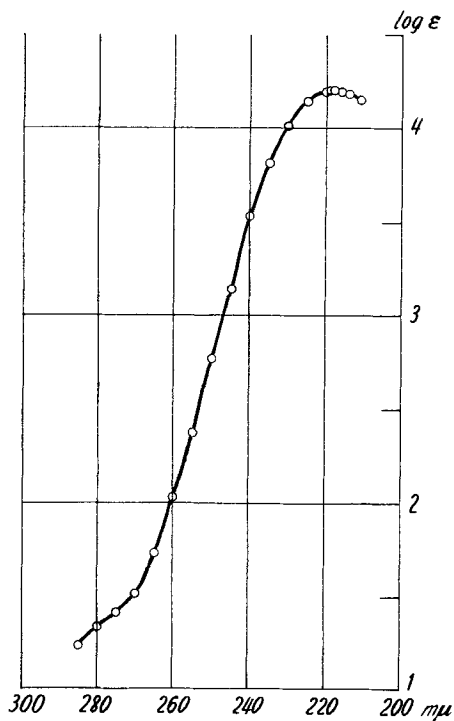


Fig. 5

UV.-Spektrum von krist.  
Desacetyl-lanatosid A in abs. Alkohol.

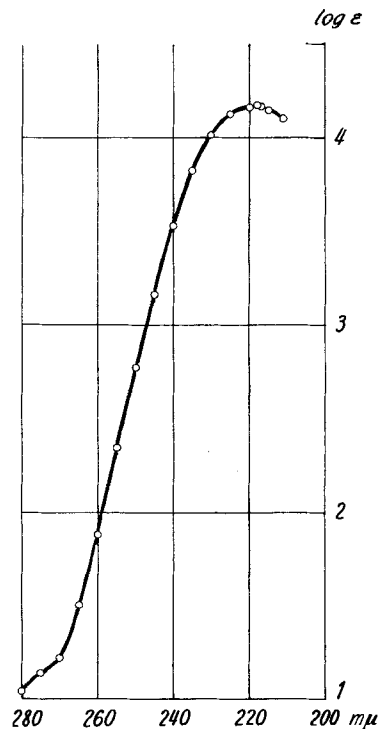


Fig. 6

UV.-Spektrum von krist.  
Desacetyl-lanatosid B in abs. Alkohol.

<sup>1)</sup> Die Verteilungszahl wurde in Chloroform-Methanol-Wasser (1:1:1) bestimmt. Siehe exp. Teil.

<sup>2)</sup> A. Stoll & W. Kreis, Helv. **16**, 1400 (1933).

<sup>3)</sup> A. Stoll & W. Kreis, Helv. **18**, 140 (1935).

Wie aus der Tab. 2 ersichtlich ist, liegt der Drehwert der kristallisierten Verbindung etwas niedriger, als er in der Literatur für die amorphen Präparate angegeben ist. Es wurden denn auch bei amorphen Präparaten aus Kristallisationsmutterlaugen für  $[\alpha]_D$  etwas höhere Werte (nämlich ca.  $+17^\circ$  bis  $+20^\circ$ ) beobachtet.

Die Absorptionskurve des kristallisierten Desacetyl-lanatosid B im UV.-Spektrum zeigt den gleichen Verlauf wie beim Desacetyl-lanatosid A, d. h. es tritt auch bei B nur das für den ungesättigten Lactonfünfring charakteristische Maximum bei  $217\text{ m}\mu$  ( $\log \epsilon = 4,17$ ) (vgl. Fig. 6) in Erscheinung.

Auch mit dem krist. Desacetyl-lanatosid B haben wir zur sicheren Identifizierung noch zwei Abbaureaktionen durchgeführt. Die Hydrolyse mit Säuren führte zu Gitoxigenin, Digilanidobiose und D-Digitoxose, die Hydrolyse mit Digilanidase aus den Blättern der *Digitalis lanata* zu Gitoxin und D-Glucose, was bestätigt, dass die kristallisierte Verbindung mit dem früher beschriebenen amorphen Desacetyl-lanatosid B chemisch identisch ist.

Der Vergleich der Differenzwerte der molekularen Drehungen<sup>1)</sup> beim Übergang der Lanatoside in die kristallisierten Desacetyl-lanatoside und von diesen in die glucosefreien Verbindungen der Digitoxinstufe zeigt für die drei Komponenten A, B und C weitgehende Übereinstimmung (Tab. 3) und bestätigt den gleichartigen Aufbau der Zuckerkette der Lanatoside A, B und C.

**Tabelle 3.**

Molekulare Drehungsdifferenzen beim Übergang der Lanatoside in die Desacetyl- und von diesen in die Desacetyl-desgluco-Verbindungen der Digitoxinstufe.

|                             | $[\alpha]_D$ <sup>2)</sup> | $[M]_D$            | $\Delta[M]_D$       |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|
| Lanatosid A . . . . .       | + 2,5 <sup>0</sup>         | + 24 <sup>0</sup>  | } + 80 <sup>0</sup> |
| Desacetyl-lanatosid A . . . | - 6 <sup>0</sup>           | - 56 <sup>0</sup>  |                     |
| Digitoxin . . . . .         | - 7 <sup>0</sup>           | - 54 <sup>0</sup>  |                     |
| Lanatosid B . . . . .       | + 11 <sup>0</sup>          | + 108 <sup>0</sup> | } + 84 <sup>0</sup> |
| Desacetyl-lanatosid B . . . | + 2,5 <sup>0</sup>         | + 24 <sup>0</sup>  |                     |
| Gitoxin . . . . .           | + 3 <sup>0</sup>           | + 23 <sup>0</sup>  |                     |
| Lanatosid C . . . . .       | + 16 <sup>0</sup>          | + 158 <sup>0</sup> | } + 83 <sup>0</sup> |
| Desacetyl-lanatosid C . . . | + 8 <sup>0</sup>           | + 75 <sup>0</sup>  |                     |
| Digoxin . . . . .           | + 11 <sup>0</sup>          | + 86 <sup>0</sup>  |                     |

<sup>1)</sup> Nach *D. H. R. Barton, Soc. 1945, 813.*

<sup>2)</sup> Mittelwerte verschiedener Bestimmungen in Pyridin. Auch der Vergleich der molekularen Drehungsunterschiede der in alkoholischer Lösung bestimmten Drehwerte ergibt ähnlich gut übereinstimmende Zahlen (für den Übergang der Lanatoside A, B und C in die entsprechenden Desacetyl-Verbindungen:  $+203^\circ$ ,  $+214^\circ$  und  $+217^\circ$ ).

Auch die Herzwirksamkeit der kristallisierten Desacetyl-Verbindungen bei intravenöser Injektion<sup>1)</sup> an Katzen stimmt mit den früher mit amorphen Präparaten gefundenen Werten überein: Für das kristallisierte Desacetyl-lanatosid A beträgt die Toxizität nach *Hatcher* 0,334 mg/kg (amorphes Präparat aus Lanatosid A = 0,337 mg<sup>2)</sup>, aus *Digitalis purpurea* = 0,36 mg<sup>3)</sup>) und für das kristallisierte Desacetyl-lanatosid B 0,397 mg/kg (amorphes Präparat aus Lanatosid B = 0,369 mg<sup>2)</sup>, aus *Digitalis purpurea* 0,41 mg<sup>3)</sup>).

Eine gewisse Unsicherheit über die Einheitlichkeit, die den amorphen Desacetylverbindungen noch anhaftete, ist durch die Überführung in wohldefinierte kristallisierte Verbindungen und durch Überprüfung ihrer Eigenschaften und Abbaureaktionen nunmehr beseitigt. Da die beiden kristallisierten Desacetyl-lanatoside A und B nicht nur durch Abbau der Lanatoside aus der *Digitalis lanata* erhalten werden, sondern zugleich die genuinen Glykoside der *Digitalis purpurea*, die Purpureaglykoside A und B darstellen, so hat damit die Bearbeitung der herzwirksamen Inhaltsstoffe dieser Droge, die medizinisch 1785 mit der Einführung in die Herztherapie durch *W. Withering* und chemisch 1869 mit der Isolierung des „*Digitaline cristallisée*“ (Digitoxin) durch *Nativelle* begann, eine Ergänzung erfahren.

### Experimenteller Teil<sup>4)</sup>.

#### Übersicht.

#### I. Desacetyl-lanatosid A (Purpureaglykosid A).

1. Darstellung aus Lanatosid A.
2. Darstellung aus der *Digitalis purpurea*.
3. Eigenschaften von kristallisiertem Desacetyl-lanatosid A.
4. Saure Hydrolyse der kristallisierten Verbindung.
5. Enzymatische Hydrolyse der kristallisierten Verbindung.

#### II. Desacetyl-lanatosid B (Purpureaglykosid B).

1. Darstellung und Eigenschaften.
2. Saure Hydrolyse der kristallisierten Verbindung.
3. Enzymatische Hydrolyse der kristallisierten Verbindung.

#### I. Desacetyl-lanatosid A (Purpureaglykosid A).

1. Darstellung aus Lanatosid A. Die Lösung von 10 g eines reinen und einheitlichen Lanatosid-A-Präparates, das aus den Spitzenfraktionen eines Chromatogramms an Magnesiumsilicat-Celite erhalten worden war, in 2,5 l Methanol, versetzte man mit der kalten Lösung von 10 g  $\text{KHCO}_3$  in 500 cm<sup>3</sup> Wasser und liess die Mischung 10 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurde die Lösung im Vakuum auf ca. 600 cm<sup>3</sup> konzen-

<sup>1)</sup> Die Werte verdanken wir Herrn Prof. *E. Rothlin*, Basel.

<sup>2)</sup> *A. Stoll & W. Kreis*, *Helv.* **16**, 1395 (1933).

<sup>3)</sup> *A. Stoll & W. Kreis*, *Helv.* **18**, 126 (1935).

<sup>4)</sup> Alle Smp. wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt. Zur Bestimmung der optischen Drehung wurden die Präparate ca. 1 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet. Die Analysen wurden in unserm mikroanalytischen Laboratorium (*Dr. W. Schöniger*) ausgeführt. Die UV.-Spektren wurden in unserm spektralanalytischen Laboratorium (*Dr. H. G. Leemann*) auf einem *Beckman*-Spektrophotometer, Modell DU, aufgenommen.

triert und mehrmals mit 100 cm<sup>3</sup> Chloroform-Alkohol (9:1) ausgeschüttelt. Die vereinigten Auszüge wurden mit wenig Wasser neutral gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft, wobei ein weisses Pulver (10 g) zurückblieb.

Eine Probe dieses Präparates (900 mg) wurde in 30 cm<sup>3</sup> Dioxan-Äther (1:1) zur Kristallisation angesetzt. Es schied sich daraus in kugeligen Aggregaten mit warzenförmigen Auswüchsen ab, die am Kolbenboden bald eine harte Kruste bildeten (520 mg). Durch Umkristallisation aus Dioxan-Äther wurden kaum bessere kristalline Ausscheidungen von Desacetyl-lanatosid A erhalten. Sie schmolzen unscharf bei 235–253° und hatten einen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = +9,7^{\circ} \pm 2^{\circ}$  (in 75-proz. Alkohol).

Da das Präparat noch nicht ganz einheitlich schien und die Kristallisation noch nicht befriedigend war, wurde das aus der alkalischen Hydrolyse stammende Desacetyl-lanatosid A nochmals durch Chromatographie an Silicagel fraktioniert. 1 g des Präparates löste man in 2 cm<sup>3</sup> Pyridin, verdünnte mit 2 cm<sup>3</sup> Essigester und liess die Lösung in eine aus 180 g Silicagel<sup>1)</sup> und 180 cm<sup>3</sup> Wasser bereitete Säule einsickern. Die Elution erfolgte mit den in Tab. 4 angegebenen Lösungsmittelgemischen in Fraktionen von je 100 cm<sup>3</sup>.

**Tabelle 4.**  
Fraktionierung von Desacetyl-lanatosid A an Silicagel.

| Fraktion | Lösungsmittel            | mg   | Eindampfrückstand | Smp.     |
|----------|--------------------------|------|-------------------|----------|
| 1–9      | Essigester + 1% Methanol | —    |                   |          |
| 11–23    | Essigester + 2% Methanol | 10   | Lack              |          |
| 24       | Essigester + 2% Methanol | 40   | krist.            | 248–260° |
| 25       | Essigester + 2% Methanol | 120  | krist.            | 256–260° |
| 26       | Essigester + 2% Methanol | 170  | krist.            | 250–258° |
| 27       | Essigester + 2% Methanol | 200  | krist.            | 267–270° |
| 28       | Essigester + 2% Methanol | 170  | krist.            | 260–267° |
| 29       | Essigester + 2% Methanol | 150  | krist.            | 260–265° |
| 30       | Essigester + 2% Methanol | 100  | krist.            | 264–269° |
| 31       | Essigester + 2% Methanol | 60   |                   | 258–265° |
| 32       | Essigester + 2% Methanol | 20   | amorph            |          |
| 33       | Essigester + 2% Methanol | Spur |                   |          |
| 34       | Essigester + 2% Methanol | —    |                   |          |

Die Kristallisation der einzelnen Fraktionen des Chromatogramms erfolgte aus Methanol-Essigester oder Alkohol-Äther-Gemischen. Auf diese Weise liessen sich aus 9 g Desacetyl-lanatosid A ca. 4,5 g kristallisiertes Material gewinnen, das man in der 80fachen Menge siedendem abs. Alkohol aufnahm. Die noch warme Lösung wurde allmählich mit dem doppelten Volumen Äther versetzt. Nach Animpfen kristallisierte das Desacetyl-lanatosid A in den in Fig. 1 abgebildeten rosettenförmig angeordneten, dünnen Blättchen. Ohne Animpfen scheidet sich auch das reine Desacetyl-lanatosid A meist in strukturlosen, linsenförmigen Partikeln ab, die erst nach längerem Stehen deutlich durchkristallisieren. Ein Spitzenpräparat, das zweimal aus Alkohol-Äther umkristallisiert war, schmolz bei 275–280°, nachdem es erst ab 270° zu sintern und sich gelblich zu verfärben begann.

2. Darstellung aus *Digitalis purpurea*. Ein ebenfalls kristallisiertes Präparat, das sich analog verhielt, konnte aus der *Digitalis purpurea* hergestellt werden. Die Droge wurde, wie früher beschrieben<sup>2)</sup>, so aufgearbeitet, dass die in den Blättern enthaltenen

<sup>1)</sup> Über die Herstellung des Silicagels siehe *A. Stoll, E. Angliker, F. Barfuss, W. Kussmaul & J. Renz*, *Helv.* **34**, 1475 (1951).

<sup>2)</sup> *A. Stoll & W. Kreis*, *Helv.* **18**, 120 (1935).



Enzyme am Abbau der genuinen Glykoside verhindert waren. Das noch rohe Purpureaglykosid A fraktionierte man zuerst an einer Säule, die mit nassem pulverisiertem Diatomitstein<sup>1)</sup> gefüllt war. Eine Lösung von 1,06 g des rohen Glykosids in einem Gemisch von 10 cm<sup>3</sup> Methanol, 2 cm<sup>3</sup> Wasser und 12 cm<sup>3</sup> Essigester wurde auf eine Säule aus 800 g Diatomitstein, der mit 400 cm<sup>3</sup> Wasser gründlich vermischt war, aufgegossen. Nun entwickelte man die Säule mit nassem, 4%-Methanol-haltigem Essigester und dampfte die Fraktionen von je 100 cm<sup>3</sup> ein. Die Eindampfrückstände der Fraktionen, die bei der *Keller-Kiliani*'schen Farbreaktion (Lösen in Eisenchlorid-haltigem Eisessig und Unterschichten mit konz. Schwefelsäure) an der Trennfläche der Schichten eine rein braune Zone zeigten und die gewichtsmässig einem deutlichen Maximum entsprachen, wurden aus Alkohol-Äther zur Kristallisation angesetzt. Nach dem Animpfen erhielt man aus diesen Fraktionen kristallisierte Ausscheidungen neben anfangs amorphen Anteilen, die aber beim längeren Stehen allmählich durchkristallisierten. Die vereinigten Rohkristallisate (600 mg) erschienen ihrem Aussehen nach noch nicht ganz einheitlich; ihr Smp. lag auch noch etwas tiefer als bei dem aus Lanatosid A hergestellten Vergleichspräparat. Sie wurden daher wie oben beschrieben nochmals in einer Silicagelsäule fraktioniert. Die so erhaltene Spitzenfraktion (45 mg) zeigte das beste Kristallisationsvermögen und erschien nach dem Umkristallisieren aus Methanol-Essigester und dann aus Alkohol-Äther sofort in den in Fig. 3 abgebildeten Formen. Das Präparat schmolz bei 278–281° und begann sich erst oberhalb 270° zu verfärben. Auch in den übrigen Eigenschaften stimmte es vollkommen mit dem durch Abbau aus Lanatosid A erhaltenen Präparat überein, so dass die Identität von Desacetyl-lanatosid A mit dem Purpureaglykosid A aus der *Digitalis purpurea* damit eine sichere Bestätigung fand.

3. Eigenschaften von kristallisiertem Desacetyl-lanatosid A. Zur Analyse wurde das um 280° schmelzende Präparat 6 Stunden bei 95° im Hochvakuum getrocknet.

$$\begin{array}{l} \text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{18} \quad \text{Ber. C } 60,89 \quad \text{H } 8,05 \quad \text{O } 31,06\% \\ (927,06) \quad \text{Gef. ,, } 61,13 \quad \text{,, } 8,27 \quad \text{,, } 30,93\%^2) \end{array}$$

*Optische Drehung in 75-proz. Alkohol:* 26,608 mg Substanz in 75-proz. Alkohol zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = 0,115^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +10,8^\circ \pm 2^\circ$$

*In Pyridin:* 24,675; 19,630 mg Substanz in Pyridin zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -0,05^\circ$ ;  $-0,045^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -5,1^\circ; -5,7^\circ \pm 2,5^\circ$$

*Alkalische Titration:* 0,1092 g im Hochvakuum zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz wurden in 20 cm<sup>3</sup> Wasser-Methanol (1:5) gelöst und nach Zugabe von 10,00 cm<sup>3</sup> 0,1-n. NaOH 45 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Rücktitration mit 0,1-n. HCl gegen Phenolphthalein ergab einen Laugenverbrauch von 1,20 cm<sup>3</sup> 0,1-n. NaOH.

Molekulargewicht Ber. 927 Gef. 910

*Verteilungszahl:* 0,1066 g krist. Desacetyl-lanatosid A wurden in einem Gemisch von je 50 cm<sup>3</sup> Methanol, Chloroform und Wasser (1:1:1) bei 25° verteilt. Die abgetrennte Chloroformschicht enthielt 0,0928 g Substanz. Die Verteilungszahl (in die Chloroformphase übergegangene Substanzmenge in %) beträgt demnach  $87 \pm 2$ .

4. Saure Hydrolyse von kristallisiertem Desacetyl-lanatosid A. Die Lösung von 1,50 g der kristallisierten Verbindung in 75 cm<sup>3</sup> Methanol wurde nach Zugabe von 75 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Schwefelsäure  $\frac{1}{2}$  Std. auf dem Dampfbad am Rückfluss erwärmt. Die klare Lösung befreite man im Vakuum vom Methanol, kühlte auf 0° und filtrierte vom auskristallisierten Aglykon ab (570 mg, Smp. 230–250°). Filtrat und Waschwasser wurden mit Chloroform ausgeschüttelt, das noch 30 mg amorphe Substanz aufnahm.

<sup>1)</sup> Über die Herstellung und Entwicklung solcher Säulen siehe *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **34**, 1431 (1951).

<sup>2)</sup> Sauerstoffbestimmung nach *J. Unterzaucher*.

Im ganzen konnten demnach 600 mg rohes Aglykon gewonnen werden, das sind 99% der berechneten Menge. Die kristallisierte Fraktion wurde durch Chromatographie an Aluminiumoxyd gereinigt und so von einer kleinen Beimengung von Anhydroprodukten befreit. Nach dem Umkristallisieren aus wässrigem Methanol schmolzen die Kristalle bei 247–250° und gaben mit Digitoxigenin keine Depression. Bei der *Keller-Kiliani*-Reaktion beobachtete man beim Durchmischen der beiden Schichten die für Digitoxigenin charakteristische grasgrüne Färbung.

*Optische Drehung:* 0,0248 g Substanz in Methanol zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = +0,185^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +18,6^\circ \pm 2^\circ$$

Für Digitoxigenin wird für  $[\alpha]_D^{20} = +18-19^\circ$  (in Methanol) angegeben<sup>1</sup>).

Zur Isolierung der bei der sauren Hydrolyse abgespaltenen Zucker wurde das von Digitoxigenin befreite wässrige saure Filtrat mit Bariumcarbonat neutralisiert und nach Abtrennung der Bariumsalze im Vakuum eingedampft. Den verbleibenden zähflüssigen Sirup löste man in 10 cm<sup>3</sup> Wasser auf, filtrierte von wenig ungelösten Anteilen ab und dampfte erneut zum Sirup ein. Dieser wurde mit 7 cm<sup>3</sup> Alkohol verdünnt und mit Digilanolidobiose angeimpft. Nachdem die rasch einsetzende Kristallisation beendet war, konnten 280 mg krist. Zucker vom Smp. 198–205° erhalten werden, der sich als Digilanolidobiose erwies.

Die Mutterlauge wurde wieder eingedampft, worauf man den Eindampfrückstand in möglichst wenig Wasser löste und diese Lösung zur weiteren Fraktionierung auf eine Säule brachte, die aus 80 g „Diatomitstein“<sup>2</sup>) durch Vermischen mit 40 cm<sup>3</sup> Wasser bereitet war. Das Chromatogramm wurde mit nassem Essigester, der 2% Alkohol enthielt, entwickelt. Fraktionen von je 100 cm<sup>3</sup> wurden getrennt eingedampft. Aus der 8. bis 15. Fraktion konnten insgesamt 310 mg Zucker, der spontan kristallisierte, isoliert werden. Durch Umkristallisation aus Essigester erhielt man daraus reine Digitoxose vom Smp. 110–112°. Der Misch-Smp. mit authentischer Digitoxose ergab keine Depression. Die *Keller-Kiliani*-Reaktion zeigte die typische, intensive Blaufärbung der 2-Desoxyzucker.

*Optische Drehung:* 20,2 mg Substanz in Wasser zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = +0,96^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +47,5^\circ \pm 2^\circ$$

Für Digitoxose in wässriger Lösung wird ein Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = +46,5-48,5^\circ$  angegeben<sup>3</sup>).

Die nachfolgenden mit Essigester-Alkohol (98:2) aus der Diatomitsteinsäule gewaschenen Fraktionen ergaben nur noch wenig uneinheitliches Material. Dagegen konnte mit Alkohol-Wasser 1:1 noch mehr Substanz (350 mg) aus der Säule herausgelöst werden, aus der sich noch 170 mg Digilanolidobiose kristallisieren liessen. Diese wurden mit der von der Chromatographie direkt auskristallisierten Menge vereint und aus Wasser-Alkohol umkristallisiert. Das reine Präparat schmolz bei 227–229° und gab in Mischung mit authentischer Digilanolidobiose (Smp. 227°<sup>4</sup>)) keine Depression. Die *Keller-Kiliani*-Reaktion fiel, wie beim Vergleichspräparat, negativ aus.

*Optische Drehung:* 20,0 mg Substanz in Wasser zu 2,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{19} = +0,58^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{19} = +29^\circ \pm 2^\circ$$

<sup>1</sup>) *A. Windaus & G. Stein*, B. **61**, 2436 (1928); *V. Hasenfratz*, C. **192**, 366 (1933); *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **16**, 1091 (1933).

<sup>2</sup>) Über die Bereitung solcher Säulen siehe die Angaben in *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **34**, 1431 (1951).

<sup>3</sup>) *M. Cloetta*, Arch. exp. Path. Pharmacol. **112**, 276 (1926); *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **16**, 1070 (1933).

<sup>4</sup>) *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **16**, 1071 (1933).

Früher haben wir für Digilanidobiose einen Drehwert von  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +30^{\circ}$  (in Wasser angegeben<sup>1</sup>).

5. Enzymatische Hydrolyse von kristallisiertem Desacetyl-lanatosid A. Ein Enzympräparat aus 200 g getrockneten Digitalis-lanata-Blättern<sup>2</sup>) wurde in die Aufschwemmung von 1 g feingepulvertem krist. Desacetyl-lanatosid A in 1 l Brunnenwasser und 80 cm<sup>3</sup> Essigester eingetragen, worauf man die Suspension unter Turbinieren drei Tage bei 35–40° hielt. Dann wurde die wässrige Lösung vom Drogenrückstand abgetrennt, mit Chloroform ausgeschüttelt, und wie weiter unter beschrieben wird, auf Glucose verarbeitet. Die Chloroformlösung hinterliess nach dem Abdampfen nur 10 mg schmieriges Material, das verworfen wurde. Den Drogenrückstand extrahierte man dreimal mit je 1 l Aceton-Wasser (1:1) und konzentrierte die vereinigten Extrakte im Vakuum auf ca. 250 cm<sup>3</sup>. Dabei kristallisierten bereits 560 mg rohes, fast farbloses Digitoxin aus. Die wässrige Mutterlauge dieser ersten Fraktion wurde mit Chloroform ausgezogen, woraus man nochmals 90 mg kristallisiertes Digitoxin erhielt, während die wässrige Schicht ebenfalls auf Zucker verarbeitet wurde. Eine weitere Menge von 100 mg rohem, krist. Digitoxin konnte noch durch Extraktion des Enzymmaterials mit Aceton allein gewonnen werden, womit die Gesamtausbeute an rohem Digitoxin auf 750 mg oder ca. 90% der Theorie anstieg.

Das Rohdigitoxin (750 mg) wurde der Reihe nach aus wässrigem Alkohol, aus Essigester und schliesslich noch aus Chloroform-Äther umkristallisiert. Das so gereinigte Präparat (400 mg) schmolz bei 250–252° und gab keine Smp.-Depression mit einem reinen Vergleichspräparat. Auch die *Keller-Kiliani*-Reaktion zeigte die gleiche Farbintensität.

*Optische Drehung*: 19,930 mg Substanz in Chloroform, das 1% Alkohol enthielt, zu 5,00 cm gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_{\text{D}}^{20} = +0,14^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$ .

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +17,6^{\circ} \pm 2,5^{\circ}$$

In Pyridin: 25,077 mg Substanz in Pyridin zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_{\text{D}}^{20} = -0,07^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$ .

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7^{\circ} \pm 2^{\circ}$$

In der Literatur werden für reines Digitoxin die Werte

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6,8^{\circ} - 7,4^{\circ} \text{ (in Pyridin)}^3 \text{ und}$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +17^{\circ} \text{ (in Chloroform mit 1\% Alkohol)}^4 \text{ angegeben.}$$

Die wässrigen Filtrate und Waschwässer aus dem Enzymversuch wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Den Eindampfrückstand löste man in 10 cm<sup>3</sup> Wasser, filtrierte durch eine Säule aus 30 g Aluminiumoxyd und wusch mit Wasser nach. Die durch eine positive *Fehling*-Reaktion ausgezeichneten Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingedampft, worauf man den Rückstand in 5 cm<sup>3</sup> Wasser löste und mit 10 cm<sup>3</sup> abs. Alkohol versetzte. Dabei entstand eine gallertige Fällung, von der durch eine dünne Talksicht abfiltriert wurde. Der beim Eindampfen des Filtrats hinterbleibende Rückstand wurde in etwas Methanol aufgenommen und von etwas unlöslichen Flocken abfiltriert. Das so an Glucose stark angereicherte Präparat wurde nun in essigsaurer Lösung mit frisch destilliertem Phenylhydrazin versetzt. Beim Erwärmen auf dem Dampfbad schieden sich gelbe Nadelchen ab, die abfiltriert und mit 1-proz. Essigsäure, Toluol und Äther gewaschen wurden (Ausbeute 240 mg). Nach dem Umkristallisieren aus heissem Alkohol gewann man kanariengelbe Nadelchen vom Smp. 210–211°, die mit D-Glucosazon keine Smp.-Depression zeigten.

<sup>1</sup>) A. Stoll & W. Kreis, Helv. **16**, 1071 (1933).

<sup>2</sup>) A. Stoll & W. Kreis, Helv. **17**, 600 (1934).

<sup>3</sup>) A. Stoll & W. Kreis, Helv. **35**, 1318 (1952).

<sup>4</sup>) A. Stoll & J. Renz, Helv. **35**, 1310 (1952).

*Optische Drehung:* 17,908 mg Substanz in Pyridin-Alkohol (1:1) zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -0,51^\circ$  (nach 5 Min.),  $-0,30^\circ$  (nach 7 Std.),  $-0,21^\circ$  (Endwert nach 24 Std.)  $\pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -71,2^\circ \pm 3^\circ \text{ (nach 5 Min.)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = -41,9^\circ \pm 3^\circ \text{ (nach 7 Std.)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = -29,3^\circ \pm 3^\circ \text{ (nach 24 Std.)}$$

Die beobachteten Werte stimmen mit den Angaben für D-Glucosazon in der Literatur<sup>1)</sup> überein.

## II. Desacetyl-ianatosid B (Purpureaglykosid B).

1. Darstellung und Eigenschaften. 5 g eines reinen und einheitlichen Lanatosid-B-Präparates wurden, wie unter I. 1. für das Lanatosid A beschrieben, mit Kaliumhydrogencarbonat in wässrigem Methanol desacetyliert. Nach dem Umfällen aus Methanol-Wasser und Reinigen mit Tierkohle erhielt man ein rein weisses amorphes Präparat (1,87 g) der Desacetyl-Verbindung. Zur weiteren Reinigung wurde es in fein gepulverter Form mit 19 cm<sup>3</sup> abs. Alkohol am Rückfluss ausgekocht. Der nach dem Erkalten ungelöst gebliebene Anteil betrug 1,46 g. Mit Lösungsmittelgemischen, wie Alkohol-Äther und Dioxan-Äther, unter Bedingungen, die beim Desacetyl-ianatosid A in diesem Reinheitsstadium bereits zur Kristallisation führten, blieb beim Desacetyl-ianatosid B der entsprechende Erfolg aus. Das ganze Präparat (1,46 g) wurde deshalb unter leichtem Erwärmen in abs. Alkohol aufgenommen, wozu 750 cm<sup>3</sup> notwendig waren. Nach vorsichtigem Einengen der filtrierten Lösung auf etwa 100 cm<sup>3</sup> setzte eine Ausscheidung ein, die makroskopisch wie eine Kristallisation aussah, unter dem Mikroskop sich jedoch als amorph erwies. Die schwerlösliche Fraktion wog 0,91 g; aus der Mutterlauge erhielt man nach dem Eindampfen noch 0,38 g leichterlöslichen Anteil.

*Optische Drehung: Schwererlösliche Fraktion:* 0,1968 g in 75-proz. Alkohol zu 20 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{19} = +0,31^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{19} = +15,8^\circ \pm 1^\circ$$

*Leichterlösliche Fraktion:* 0,2124 g in 75-proz. Alkohol zu 20 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = +0,36^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +17,0^\circ \pm 1^\circ$$

Die beiden Fraktionen unterschieden sich demnach in ihrem Drehwert nur geringfügig; doch schien es, als ob in der Mutterlauge etwas höher drehende Beimengungen angereichert worden wären.

Mit der schwerlöslichen Spitzenfraktion wurden nun weitere Kristallisationsversuche ausgeführt. Unter anderem verwendete man auch ein Gemisch von Chloroform-Methanol (5:1) als Lösungsmittel. Wurden damit bereitete Lösungen mit wechselnden Mengen Äther verdünnt, so erfolgten anfangs auch nur amorphe Abscheidungen. Erst nach mehrtägigem Stehen konnte man in einigen Ansätzen neben den amorphen Partikeln auch einzelne kleine Kristallbüschel erkennen, die sich allmählich etwas vergrößerten und schliesslich nach dem Abgiessen des Lösungsmittels mit dem Spatel herausgehoben und von den amorphen Anteilen abgetrennt werden konnten. Damit war etwas Impfmateriale für weitere Versuche gewonnen.

0,5 g der schwerlöslichen Spitzenfraktion wurden nun in 150 cm<sup>3</sup> Chloroform-Methanol 5:1 gelöst. Diese Lösung wurde mit 100 cm<sup>3</sup> trockenem Äther vermischt, worauf nach wenigen Min. eine starke Trübung einsetzte, die durch Filtration beseitigt wurde. Nach sofortigem Animpfen begann an Kratzstellen allmählich die Kristallisation des Desacetyl-ianatosid B in feinen Nadelchen, die meist in Büscheln angeordnet waren.

<sup>1)</sup> N. M. Shah, K. Meyer & T. Reichstein, Pharm. acta Helv. 24, 140 (1949).

4—5 Tage später schien die Kristallisation beendet. Man goss die klare Mutterlauge ab, spülte die Kristalle mit Äther heraus und wusch sie nach (0,251 g). Die Mutterlauge enthielt noch etwa 100 mg Glykosid; die auf dem Filter zurückgebliebene Substanz, die sich nach dem Ätherzusatz als Trübung abgeschieden hatte, wog etwa 150 mg. Auch aus diesen beiden Fraktionen liessen sich noch kleine Mengen in kristallisierter Form gewinnen. Insgesamt wurden etwa 65—70% der amorphen Ausgangssubstanz durch diese Kristallisationsmethode in kristallisierte Form übergeführt.

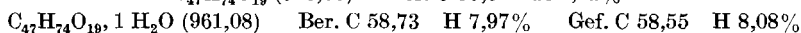
Aus den bisher beschriebenen Versuchen ergab sich, dass es notwendig ist, für die Kristallisation eine ziemlich hohe Verdünnung einzuhalten. Die folgende Methode führte bei Verwendung eines genügend reinen Ausgangsmaterials dann auch zum Ziel: 1 g Desacetyl-lanatosid B (am besten das Rohkristallisat) löste man in 450 cm<sup>3</sup> des Gemisches Chloroform-Methanol 5:1. Bei Zugabe von 300 cm<sup>3</sup> Äther trat meist keine amorphe Trübung mehr auf. Nach wenigen Min. wurde geimpft, worauf die Kristallisation bald einsetzte<sup>1)</sup>. Sie wurde erst nach 4—8 Tagen abfiltriert. Wenn nicht geimpft wurde, so begann die Kristallisation etwas später. Es kam gelegentlich, namentlich bei zu hoher Konzentration der Lösung, vor, dass sich die Substanz zu rasch abschied, und dann waren neben den Kristallen auch wieder amorphe Ausscheidungen erfolgt. Diese verschwanden jedoch nach tagelangem Stehen wieder.

Nach zwei- bis dreimaligem Umkristallisieren schien das Präparat vollkommen rein und einheitlich (Fig. 4), was auch aus der Konstanz seiner Eigenschaften hervorging.

Verwendete man für die Herstellung von Desacetyl-lanatosid B ein weniger einheitliches Lanatosid-B-Präparat, so erwies es sich als vorteilhaft, die rohe Desacetylverbindung an einer Säule aus Diatomitstein zu fraktionieren. Eine entsprechende Fraktionierung an Diatomitstein wurde auch vorgenommen, um ein aus Blättern von *Digitalis purpurea* hergestelltes amorphes Präparat von Purpureaglykosid B<sup>2)</sup> in die kristallisierte Form überzuführen.

Auf eine Säule, die aus der Mischung von 800 g Diatomitstein mit 400 cm<sup>3</sup> Wasser bereitet war, wurde 1 g amorphes Desacetyl-lanatosid B, das in der Mischung von 20 cm<sup>3</sup> Methanol, 4 cm<sup>3</sup> Wasser und 24 cm<sup>3</sup> Essigester gelöst war, aufgegossen. Die Säule wurde mit nassem Essigester, der 5% Methanol enthielt, entwickelt. Die Eindampfrückstände der einzelnen Fraktionen 7 bis 12 von je 100 cm<sup>3</sup> (insgesamt 576 mg) liessen sich kristallisieren, und zwar die Spitzenfraktionen bis zu 85%, die Randfraktionen bis zu ca. 50%. Diese Rohkristallisate wurden dann wie oben angegeben zwei- bis dreimal umkristallisiert. Ein solches Präparat schmolz bei 240—242°. Bei der *Keller-Kiliani*-Reaktion entstand unterhalb der Berührungsfläche der beiden Schichten eine intensiv karminrot gefärbte Zone, während sich in der Eisessigschicht die für Digitoxose charakteristische tiefblaue Farbe entwickelte.

Zur Analyse wurde die Substanz 6 Std. im Hochvakuum bei 100° getrocknet; sie verlor dabei 7 bis 9% an Gewicht. Trotzdem wurde das Präparat nicht kristallwasserfrei erhalten, wie aus der Analyse hervorgeht:



*Optische Drehung:* In 75-proz. Alkohol: 0,1413 g Substanz zu 20 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = +0,22^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +15,6^\circ \pm 1,5^\circ$$

In Pyridin: 0,2831 g Substanz zu 20 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{19} = +0,07^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{19} = +2,5^\circ \pm 0,7^\circ$$

<sup>1)</sup> Auf die gleiche Art liess sich auch Desacetyl-lanatosid A mit Erfolg kristallisieren. Vgl. Fig. 2.

<sup>2)</sup> *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **18**, 120 (1935).

*Alkalische Titration:* 0,1403 g im Hochvakuum getrocknete Substanz wurden in 20 cm<sup>3</sup> Methanol-Wasser 5:1 gelöst und blieben nach Zugabe von 10 cm<sup>3</sup> 0,1-n. NaOH 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Die Rücktitration mit 0,1-n. HCl gegen Phenolphthalein ergab einen Laugenverbrauch von 1,47 cm<sup>3</sup> 0,1-n. NaOH.

Molekulargewicht Ber. 943 Gef. 955

*Verteilungszahl:* 0,094 g krist. Desacetyl-ianatosid B wurden in einem Gemisch von je 50 cm<sup>3</sup> Chloroform, Methanol und Wasser bei 25° verteilt. Die abgetrennte Chloroformschicht enthielt 0,049 g Substanz, was einer Verteilungszahl von 52 entspricht.

2. Saure Hydrolyse von kristallisiertem Desacetyl-ianatosid B. Die Lösung von 1,5 g der kristallisierten Verbindung in 150 cm<sup>3</sup> heissem Methanol wurde mit dem gleichen Volumen 0,1-n. Schwefelsäure vermischt und ½ Std. auf dem Dampfbad am Rückfluss erwärmt. Dann wurde die klare Lösung im Vakuum auf etwa das halbe Volumen eingengt, wobei sich das Aglykon in kristallisierter Form ausschied. Nach zweistündigem Stehen in der Kälte konnten 550 mg Gitoxigenin abfiltriert werden. Filtrat und Waschwascher wurden noch mit Chloroform ausgeschüttelt, woraus sich noch 50 mg schwach gelbliche Kristalle des Aglykons gewinnen liessen.

Die Gesamtmenge des Aglykons (600 mg) lieferte nach dem Umkristallisieren aus 20 cm<sup>3</sup> heissem abs. Alkohol 470 mg reines Gitoxigenin vom Smp. 224–230°. Die Mischprobe mit authentischem Gitoxigenin ergab keine Depression.

*Optische Drehung:* 24,791 mg Substanz mit Methanol zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = +0,34^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +34,3^\circ \pm 2,5^\circ$$

Die gefundenen Werte für Smp. und Drehung stimmen mit denjenigen der Literatur überein<sup>1)</sup>. Bei der *Keller-Kiliani*-Reaktion entstand beim Durchmischen der beiden Schichten die für Gitoxigenin charakteristische tief karminrote Färbung.

Zur Isolierung der Zucker wurde die schwefelsaure Aglykonmutterlauge mit den Waschwässern vereinigt und mit in wenig Wasser aufgeschlammtem Bariumcarbonat neutralisiert. Man filtrierte von den Bariumsalzen ab und dampfte das Filtrat zur Trockne, wobei 0,95 g eines farblosen Zuckersirups hinterblieben. Es wurde in 7 cm<sup>3</sup> warmem abs. Alkohol aufgenommen, worauf sich aus der klaren Lösung beim Abkühlen weisse Nadelchen (310 mg) von roher Digilanidobiose (Smp. 217–220°) ausschieden. Umkristallisieren aus Wasser-Alkohol (1:5) erhöhte den Smp. auf 227–229°. Der Mischschmelzpunkt mit authentischer Digilanidobiose zeigte keine Depression.

*Optische Drehung:* 22,888 mg Substanz mit Wasser zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = +0,27^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +29,5^\circ \pm 2^\circ$$

Die nach dem Abtrennen der Digilanidobiose zurückbleibende alkoholische Mutterlauge wurde eingedampft und der Eindampfrückstand (660 mg) an einer Säule aus Diatomitstein fraktioniert. Bei der Elution mit nassem Essigester, der 2% Alkohol enthielt, sind die Fraktionen zusammengefasst worden, welche die für Digitoxose charakteristische *Keller-Kiliani*-Reaktion gaben. Durch anschliessende Elution mit Alkohol-Wasser (1:1) konnte noch etwas Digilanidobiose gewonnen werden. Es liessen sich so 330 mg rohe D-Digitoxose und noch 90 mg Digilanidobiose isolieren. Die D-Digitoxose lieferte nach dem Umkristallisieren aus Essigester massive Prismen vom Smp. 110–112° (Sintern ab 108°). Die Mischprobe mit authentischer Digitoxose ergab keine Depression.

*Optische Drehung:* 25,8 mg 1 Std. im Hochvakuum bei 60° getrocknete Substanz mit Wasser zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = +0,50^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +48,4^\circ \pm 2^\circ$$

<sup>1)</sup> *M. Cloetta*, Arch. exp. Path. Pharmacol. **112**, 273 (1926); *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **16**, 1049 (1933).

Zusammengefasst konnten bei der sauren Hydrolyse von 1,5 g kristallisiertem Desacetyl-lanatosid B 600 mg Gitoxigenin (97% der Theorie), 400 mg Digilanidobiose (81%) und 330 mg D-Digitoxose (70%) isoliert werden.

3. Enzymatische Hydrolyse von kristallisiertem Desacetyl-lanatosid B. 1 g der kristallisierten Verbindung wurde wie unter I. 5. für Desacetyl-lanatosid A angegeben mit einem Enzympräparat aus Blättern der *Digitalis lanata* partiell abgebaut. Es konnten 700 mg krist. Roh-Gitoxin isoliert werden, die man zuerst mit 20 cm<sup>3</sup> Chloroform verrieb. Ein schwerer löslicher Anteil (500 mg), der zurückblieb, wurde in 500 cm<sup>3</sup> heissem 75-proz. Alkohol gelöst und die Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Nach ca. 15 Min. setzte eine Kristallisation von farblosen Blättchen ein, die bei 278–280° schmolzen und mit reinem Gitoxin keine Smp.-Depression zeigten

*Optische Drehung:* 27,750 mg Substanz mit Pyridin zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = +0,05^\circ \pm 0,02^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = +4,5^\circ \pm 2^\circ$$

Smp. und Drehwert stimmen mit den Angaben der Literatur<sup>1)</sup> überein. Der hohe Smp., der niedere Drehwert, die Schwerlöslichkeit in Alkohol und Chloroform sind für Gitoxin charakteristisch.

Bei der Aufarbeitung aller Fraktionen konnten aus 1 g Desacetyl-lanatosid B 730 mg Gitoxin gewonnen werden, was 88% der Theorie entspricht.

Die vereinigten wässerigen Phasen wurden, wie beim enzymatischen Abbau von Desacetyl-lanatosid A (I. 5.) beschrieben, auf Zucker verarbeitet und dieser mit Phenylhydrazin umgesetzt. Es konnten 240 mg der gelben Nadeln des D-Glucosazons erhalten werden, die, aus Alkohol umkristallisiert, bei 209–210° schmolzen.

*Optische Drehung:* 20,772 mg mit Pyridin-Alkohol (1:1) zu 5,00 cm<sup>3</sup> gelöst; 2-dm-Rohr;  $\alpha_D^{20} = -0,57^\circ$  (nach 7 Min.),  $-0,25^\circ \pm 0,02^\circ$  (Endwert).

$$[\alpha]_D^{20} = -68,6^\circ \pm 2,5^\circ \text{ (nach 7 Min.)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = -30,1^\circ \pm 2,5^\circ \text{ (Endwert nach 24 Std.)}$$

Die Verbindung ist nach Smp., Misch-Smp. und Drehwerten identisch mit D-Glucosazon.

### Zusammenfassung.

Die Desacetyl-lanatoside A und B, die aus den entsprechenden Lanatosiden der *Digitalis lanata* durch Desacetylierung entstehen und die damit identischen Purpureaglykoside A und B, die genuinen Herzglykoside aus der *Digitalis purpurea*, sind bisher nur als amorphe Verbindungen beschrieben worden. Sie konnten nun in kristallisierter Form erhalten und charakterisiert werden. Die Eigenschaften der früher beschriebenen amorphen Verbindungen und der neuen kristallisierten Präparate stimmen weitgehend überein. Abbaureaktionen mit den kristallisierten Präparaten bestätigen die bisherigen Angaben über den chemischen Aufbau dieser Herzglykoside.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium  
*Sandoz*, Basel.

<sup>1)</sup> *M. Cloetta*, Arch. exp. Path. Pharmacol. **112**, 261 (1926); *S. Smith*, Soc. **1931**, 23; *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **17**, 608 (1934).