

ches von *L. C. Craig* durch multiplikative Verteilung gereinigt worden war, besass gleiches Verhalten bei der Kristallisation, Smp. 277–278° (Zers.) nach Sintern bei 272°. Die synthetische Verbindung besass $[\alpha]_D^{24} = -289^\circ \pm 10^\circ$ ($c = 0,43$ in 70-proz. Äthanol, v/v).

Trocknen 20 Std. bei 90/10² mm über P₂O₅.

C ₆₀ H ₉₂ O ₁₀ N ₁₂ , 2 HCl, 3 H ₂ O	Ber. C	56,81	H	7,95	N	13,25%	N/C	0,2335
	Gef. „	56,76	„	7,85	„	13,17%	„	0,2320

Die Analysen wurden in unseren mikroanalytischen Laboratorien unter der Leitung von Herrn Dr. *H. Gysel* durchgeführt. Die IR.-Spektren und Röntgenaufnahmen verdanken wir den Herren Dr. *E. Ganz* und PD. Dr. *H. Labhart*.

SUMMARY.

The synthesis of gramicidin S¹⁰), a peptide antibiotic from *Bac. brevis*, is described in detail. The decapeptide derivative trityl·(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)₂·OCH₃ (L-L-L-D-L)₂ is converted to the corresponding p-nitrophenyl ester, the trityl group is removed selectively, and the resulting product is cyclised to cyclo-(Val-p-Tos·Orn-Leu-Phe-Pro)₂·2 H₂O (L-L-L-D-L)₂. Sodium in liquid ammonia removes the p-toluene-sulfonyl groups, and cyclo-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)₂ (L-L-L-D-L)₂ is obtained as dihydrochloride (I). The cyclic products are purified by countercurrent distribution and identified with gramicidin S ditosylate and gramicidin S dihydrochloride²¹) respectively. This proves the structure of gramicidin S as cyclic decapeptide, and constitutes the first synthesis of a naturally occurring cyclic peptide.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel
Pharmazeutische Abteilung.

83. Die Glykoside der Blätter von *Digitalis grandiflora* Mill. (= *Digitalis ambigua* Murr.)

Glykoside und Aglykone, 176. Mitteilung¹⁾

von **R. Repič** und **Ch. Tamm**.

(13. III. 57.)

Von den heute etwa 30 bekannten Arten der Gattung *Digitalis*, die zur Familie der Scrophulariaceae gehört, sind die *D. purpurea* L. und *D. lanata* Ehrh. chemisch am eingehendsten untersucht worden. Chemische Angaben liegen aber auch über *D. canariensis* L., *D. cariensis* Boiss., *D. ferruginea* L., *D. leucophaea* Sibth., *D. lutea* L., *D. mariana* Boiss., *D. micrantha* Roth, *D. orientalis* Lam. und *D. thapsi* L. vor²⁾.

¹⁾ 175. Mitteilung: *W. Kreis, Ch. Tamm & T. Reichstein*, Helv. **40**, 593 (1957).

²⁾ Nähere Angaben finden sich in der kürzlich erschienenen schönen Übersicht über die herzwirksamen Glykoside der Digitalisarten von *Stoll & Renz*³⁾.

Im folgenden berichten wir über eine orientierende chemische Untersuchung der Blätter der *Digitalis grandiflora* Miller, die früher als *Digitalis ambigua* Murray bezeichnet worden ist³⁾4). Diese Digitalisart kommt in Mittel- und Osteuropa vor. Vergleichende biologische Versuche am Frosch und Meerschweinchen von seiten verschiedener Autoren zeigten, dass die Blätter von *D. grandiflora* ähnliche Wirksamkeit wie diejenigen von *D. purpurea* besitzen⁵⁾6)⁷⁾8)⁹⁾.

D. grandiflora ist deswegen neben *D. purpurea* in verschiedenen Ländern officinell. Bei der kolorimetrischen Bestimmung des Gehaltes an herzwirksamen Glykosiden in der Droge haben Fuchs et al.⁹⁾ je nach der herangezogenen Methode sehr unterschiedliche Resultate erhalten. Bei der Verwendung von Farbreaktionen, die auf den Butenolidring der herzwirksamen Aglykone ansprechen (z. B. Kedde-Reaktion), werden wesentlich kleinere Glykosidgehalte gefunden als bei der Bestimmung mit der Keller-Kiliani-Reaktion, welche die 2-Desoxyzucker erfasst¹⁰⁾11). Demnach scheinen in den Blättern der *D. grandiflora* grössere Mengen von Glykosiden vorzukommen, die zwar 2-Desoxyzucker enthalten, sich aber nicht von den herkömmlichen Cardenoliden ableiten. Über einen ersten chemischen Beweis für die Richtigkeit dieser Vermutung berichteten kürzlich Stoll & Renz³⁾. Es gelang ihnen nicht, aus den Blättern der *D. grandiflora* ein herzwirksames digitaloides Glykosid in reiner Form zu isolieren. Als einzigen krist. Stoff erhielten sie ein herzwirksames Glykosid (als D A 7 bezeichnet) vom Smp. 287° und $[\alpha]_D^{20} = +37,1^\circ$ (in Pyridin), das eine positive Keller-Kiliani-Reaktion gab, bei dem aber die Legal- und Baljet-Reaktion negativ ausfielen. Die anderen amorphen Glykosidfraktionen stellten nach den Papierchromatogrammen sehr komplizierte Gemische dar. Weitere chemische Untersuchungen über *D. grandiflora* sind unseres Wissens bisher nicht durchgeführt worden.

Beschaffung des Ausgangsmaterials.

Für unsere eigenen Untersuchungen, die beim Erscheinen der Arbeit von Stoll & Renz³⁾ bereits abgeschlossen waren, standen Blätter von *D. grandiflora* zur Verfügung, die im Juli 1955 auf der Berg-

³⁾ A. Stoll & J. Renz, Verhandl. Naturf. Gesell. Basel **67**, 392 (1956).

⁴⁾ G. Hegi, Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. VI, 1. Hälfte, S. 68.

⁵⁾ S. Birnacki, Roczniki Farmacji **1**, 57 (1923); Chem. Zbl. **1924**, II, 212.

⁶⁾ G. Fritsch, Ber. ungar. pharmaz. Gesell. **2**, 158 (1926); Chem. Zbl. **1928**, I, 1550.

⁷⁾ O. Dajert u. F. Lasch, Pharmac. Acta Helv. **1**, 79 (1926).

⁸⁾ J. Scagliola, Gior. farmac. chim. **76**, 197 (1927).

⁹⁾ L. Fuchs, E. Soos & I. Kabert, Sci. pharm. **19**, 73 (1951).

¹⁰⁾ Die Keller-Kiliani-Reaktion spricht allerdings nur auf 2-Desoxyzucker an, wenn sie nicht mit einer weiteren Glucose oder Methylpentose verknüpft sind. Vgl. W. Nagata, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. **40**, 41 (1957).

¹¹⁾ Der Glykosidgehalt wird jeweils in Prozent der getrockneten Droge, bezogen auf Digitoxin als Standard, angegeben.

kette Gorjanci in Slowenien (Jugoslawien) gesammelt und sofort an der Luft und dann im Trockenschrank bei maximal 40° getrocknet wurden. Die botanische Identifizierung wurde von Herrn *Vinco Velušček*¹²⁾, Ljubljana, durchgeführt.

Extraktion der Blätter.

Eine Probe des Blattpulvers wurde zunächst so extrahiert, dass die darin enthaltenen Enzyme nicht zur Wirkung gelangen sollten. Es wurde deshalb zuerst mit siedendem Alkohol behandelt, dann wie üblich¹³⁾ mit Alkohol und Alkohol-Wasser-Gemischen extrahiert, die Extrakte mit Petroläther und Pb(OH)₂ gereinigt und schliesslich fraktioniert ausgeschüttelt. Über die Ausbeuten orientiert Tab. I. Da es im Verlaufe der weiteren Untersuchung nicht gelang, aus den so erhaltenen Rohextrakten genuine Glykoside zu isolieren, wurde die Hauptmenge des Blattpulvers mit Fermentierung aufgearbeitet, indem es zuerst mit Wasser 24 Std. bei 40° stehen gelassen wurde. Die weitere Aufarbeitung wurde wie bei der Probe ohne Fermentierung durchgeführt und ergab die in Tab. I erwähnten Ausbeuten¹⁴⁾.

Tabelle I.
Ausbeuten an Rohextrakten¹⁵⁾.

Vorprobe ohne Fermentierung (500 g)			Hauptmenge mit Fermentierung (2,30 kg)		
Extrakt	g	%	Extrakt	g	%
Pe-Extrakt A	11,85	2,36	Pe-Extrakt B	29,32	1,28
Ae-Extrakt A	1,050	0,21	Ae-Extrakt B	5,127	0,223
Chf-Extrakt A	1,350	0,27	Chf-Extrakt B	3,790	0,165
Chf-Alk-(4:1)-Extr. A . . .	0,950	0,19	Chf-Alk-(4:1)-Extr. B . . .	4,057	0,177
Chf-Alk-(2:1)-Extr. A . . .	2,850	0,57	Chf-Alk-(2:1)-Extr. B . . .	6,020	0,262
Total (excl. Pe-Extr.) . . .	6,200	1,24	Total (excl. Pe-Extr.) . . .	18,994	0,827

Tab. I zeigt, dass die Fermentierung die Verteilung des glykosidischen Materials auf die verschiedenen Extrakte nicht wesentlich beeinflusst hat. Die Rohextrakte wurden zunächst orientierend im Papierchromatogramm geprüft. Da die Extrakte B (d. h. mit Fermentierung) praktisch die gleichen Papierchromatogramme ergaben, sind nur Beispiele für die Extrakte A wiedergegeben (vgl. Fig. 1 und 2).

¹²⁾ Herrn *Vinco Velušček*, Ljubljana, sei auch an dieser Stelle für seine Bemühungen gedankt.

¹³⁾ *J. v. Euw, H. Hess, P. Speiser & T. Reichstein*, *Helv.* **34**, 1821 (1951).

¹⁴⁾ Die Herstellung dieser Rohextrakte war durch das Auftreten hartnäckiger Emulsionen bei den Ausschüttelungen sehr erschwert. Sie werden durch schleimige Begleitstoffe verursacht.

¹⁵⁾ Für die hier und im folgenden verwendeten Abkürzungen vgl. die Einleitung zum Exper. Teil.

Sie zeigen, dass komplizierte Stoffgemische vorliegen, wobei die mit *Kedde*-Reagens entwickelten Flecke sicher nur einen Teil der vorhandenen Substanzen wiedergeben. Beim Entwickeln mit SbCl_3 treten zusätzliche Flecke auf. Da die Rohextrakte stark gefärbt waren, stiess das Sichtbarmachen der Flecke in den Chromatogrammen auf Schwierigkeiten.

Untersuchung der Rohextrakte.

Alle Versuche, aus den in Tab. I genannten Rohextrakten (ausser den Chf-Alk-(2:1)-Extrakten A und B, die noch nicht untersucht wurden), krist. Stoffe zu gewinnen, schlugen fehl. Die Rohextrakte wurden deshalb einzeln einer milden sauren Hydrolyse unterworfen, um die Genine der enthaltenen Glykoside, die sich von 2-Desoxyzuckern ableiten, isolieren zu können. Durch Chromatographie an Al_2O_3 der Geninfraktionen (= Chloroform-Äther-(1:3)-lösliche Anteile), die 24 bis 36% des Ausgangsmaterials ausmachten, gelang es, die Genine B, D, E, F und H in Kristallen zu fassen. Diese fünf Stoffe stellen nach ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften (Analyse, Farbreaktionen, UV.- und IR.-Spektren usw., siehe unten) neue sog. C_{21} -Genine dar. Die zwei weiteren isolierten krist. Genine C und G waren mit Digitoxigenin (C) und Gitoxigenin (G) identisch. Genin A wurde nur als amorphes Konzentrat erhalten. Wahrscheinlich liegt ebenfalls ein digitaloides Lacton vor, das aber noch nicht identifiziert werden konnte.

In den wasserlöslichen Anteilen (= Zuckerfraktion) der ohne Fermentierung erhaltenen Rohextrakte A, die 53–64% des Ausgangsmaterials ausmachten, liessen sich im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 8 und 9) vier Zuckerflecke nachweisen. Nach den Rf-Werten liegen Glucose, Digilanidobiose und Digitoxose vor. Der vierte Fleck liess sich nicht zuordnen. Die Digilanidobiose konnte aus dem Zuckergemisch durch Kristallisation in papierchromatographisch reiner Form abgetrennt werden. Der rohe Zuckersirup aus den hydrolysierten Rohextrakten B (mit Fermentierung) zeigte im Papierchromatogramm drei Flecke (vgl. Fig. 9). Der langsamste und schwächste entsprach der Glucose, der mittlere und stärkste der Digitoxose; der schnellste lief wie Cymarose. Nach weiterer Reinigung des Zuckersirups durch Destillation im Molekularkolben wurde D-Digitoxose in reinen Kristallen erhalten.

Über die Ausbeuten an krist. Geninen, die nach milder saurer Hydrolyse der nach Fermentierung erhaltenen Rohextrakte erhalten wurden, orientiert Tab. II.

Aus Tab. II ist ersichtlich, dass 2,16mal mehr sog. C_{21} -Genine, die keine digitaloiden Lactone sind (zur Konstitution siehe weiter unten), als Cardenolide isoliert worden sind, d. h. die C_{21} -Genine machen 68% und die Cardenolide 32% der Gesamtmenge aus. Dieser Be-

fund steht, vorläufig noch in rein qualitativer Hinsicht, im Einklang mit den eingangs erwähnten Ergebnissen der kolorimetrischen Bestimmungen des Glykosidgehaltes von *Fuchs et al.*⁹⁾¹⁶⁾. Wir selbst fanden bei der kolorimetrischen Bestimmung der gesamten chloroformlöslichen Glykoside an unserem Drogenmuster, berechnet auf Digitoxin, auf Grund der *Kedde*-Reaktion einen Gehalt von 0,11% und nach der *Keller-Kiliani*-Reaktion 0,42%, d. h. etwa 75% C₂₁-Genin-tridigitoxoside und etwa 25% Cardenolid-tridigitoxoside¹⁶⁾.

Tabelle II.

Ausbeuten der nach milder saurer Hydrolyse der Rohextrakte B isolierten krist. Genine.

Stoff	Isolierte Mengen in mg (Umgerechnet auf 2,3 kg trockene Blätter)				
	Ae-Extr. B	Chf-Extr. B	Chf-Alk- (4:1)- Extr. B	Total	
				mg	%
Genin B	93,0	8,6	—	101,6	0,0044
Genin D	73,2	22,8	13,2	103,2	0,0047
Genin E	46,2	—	—	46,2	0,0020
Genin F	—	73,2	—	73,2	0,00317
Genin H	—	—	16,0	16,0	0,00070
Total C ₂₁ -Genine . . .	212,4	104,6	29,2	346,2	0,01497
Genin A (amorph) . . .	Spur	—	—	Spur	—
Genin C = Digitoxigenin	80,2	31,8	47,8	159,8	0,0069
Genin G = Gitoxigenin .	—	2,3 ¹⁷⁾	—	2,3	0,00001
Total Cardenolide . . .	80,2	34,1	47,8	162,1	0,00691
Total Genine	292,6	136,4	77,0	508,3	0,02188

Die tatsächlich isolierte Digitoxigenin-Menge entspricht einem Gehalt von 327 mg bzw. 0,0142% Digitoxin, was bedeutend weniger ist, als auf Grund der kolorimetrischen Bestimmungen errechnet worden ist. Die ausserordentlich kleine Gitoxigenin-Menge lässt auf einen entsprechend geringen Gitoxin-Gehalt schliessen. Diese Zahlen stellen aber Minimalwerte dar, da der Chf-Alk-(2:1)-Extrakt B und die noch stärker wasserlöslichen Anteile nicht berücksichtigt sind. Zu einer weiteren Erhöhung des Glykosidgehaltes dürften auch die Genine beitragen, die unter den angewandten Bedingungen nicht hydrolysierbar sind und somit nicht erfasst worden sind.

¹⁶⁾ Der Glykosidgehalt der Droge beträgt nach *Fuchs et al.*⁹⁾, berechnet als Digitoxin auf Grund der Farbreaktionen, die auf den Butenolidring ansprechen (*Baljet*, *Legal*, *Kedde*) 0,15–0,16% und auf Grund der auf 2-Desoxyzucker ansprechenden *Keller-Kiliani*-Reaktion 0,23%. Dies würde heissen, dass auf der Basis von Digitoxin berechnet etwa 66% Cardenolid-tridigitoxoside und 34% Tridigitoxoside, die sich von C₂₁-Geninen ableiten, vorliegen.

¹⁷⁾ Aus dem Chf-Extrakt A isoliert.

Beispiele für die Papierchromatographie der Rohextrakte und Genine.

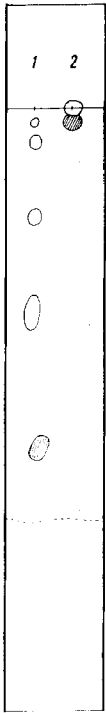


Fig. 1¹⁸⁾.
Be-Chf-(9:1):
Fmd-An-(1:3)
3 Std., 22°.

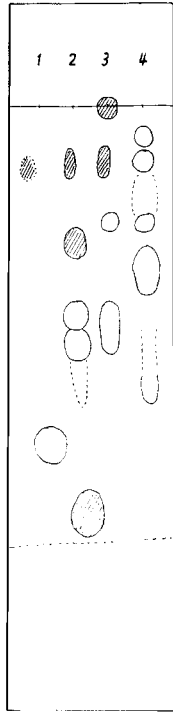


Fig. 2¹⁸⁾.
Chf-THF: Fmd
12 Std., 22°.

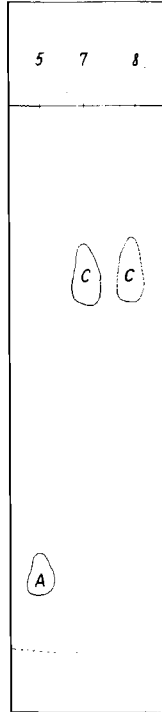


Fig. 3¹⁸⁾.
Be-Chf-(9:1):
Fmd-An-(1:3)
3 Std., 22°.

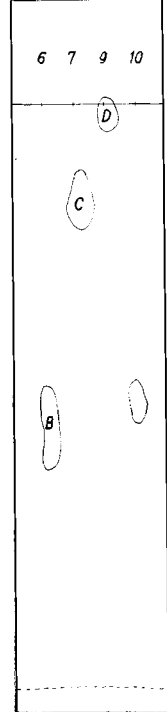


Fig. 4¹⁹⁾.
Be:Pgl-W-(4:1)
4 Std., 22°.

Charakterisierung der isolierten Stoffe.

Die Eigenschaften der neuen krist. C₂₁-Genine sind in Tab. III zusammengestellt, wobei zum Vergleich die bekannten verwandten Stoffe aufgeführt sind. Zu diesen und den andern isolierten Geninen ist folgendes zu bemerken:

Subst. A wurde zwar papierchromatographisch einheitlich (vgl. Fig. 3), aber nur als amorphes Konzentrat in kleiner Menge erhalten.

¹⁸⁾ Mit *Raymond*-²⁰⁾ resp. *Kedde*-Reagens²¹⁾ oder mit Lösung von 25-proz. Trichloroessigsäure in Chloroform²²⁾ (Fluoreszenzfarbe unter der UV.-Lampe²³⁾) entwickelt. Die schraffierten Flecke sind nur nach Entwickeln mit Trichloroessigsäure unter der UV.-Lampe sichtbar.

¹⁹⁾ Mit 20-proz. Lösung von SbCl₃ in Chloroform entwickelt²⁴⁾.

²⁰⁾ O. Schindler & T. Reichstein, *Helv.* **34**, 108 (1951).

²¹⁾ I. E. Bush & D. A. H. Taylor, *Biochem. J.* **52**, 643 (1952).

²²⁾ A. B. Svendsen & K. B. Jensen, *Pharmac. Acta Helv.* **25**, 241 (1950).

²³⁾ Es wurde eine *Hanovia*-*Chromatolite*-UV.-Lampe benützt, die ca. 80% ihres Lichtes bei ca. 254 m μ aussendet.

²⁴⁾ D. Lawday, *Nature* **170**, 415 (1952); P. Zoller & Ch. Tamm, *Helv.* **36**, 1744 (1953).

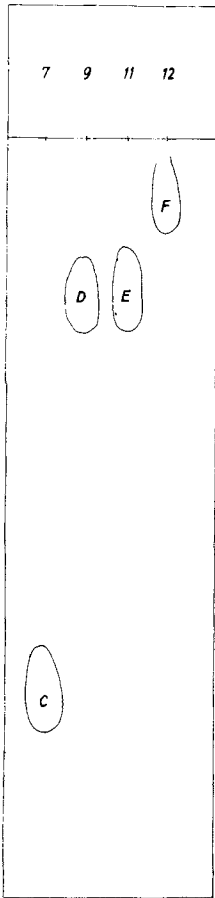


Fig. 5¹⁹).
Be-Chf-(1:1):Pgl-
W-(1:1)
12 Std., 22°.

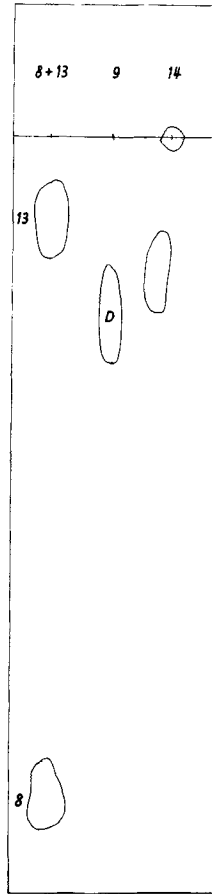


Fig. 6¹⁹).
Be-Chf-(1:1):
Pgl-W-(4:1)
5 Std., 22°.

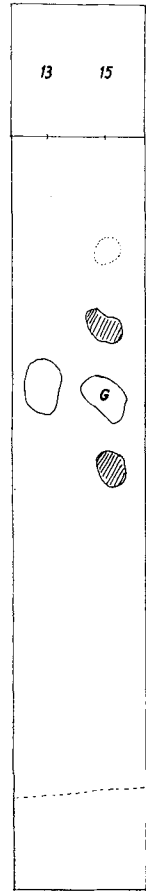


Fig. 7¹⁸).
Chf-THF-
(1:1): Fmd
12 Std., 22°.

- 1 = 0,80 mg Ae-Extrakt A.
- 2 = 0,80 mg Chf-Extrakt A.
- 3 = 0,80 mg Chf-Alk-(4:1)-Extrakt A.
- 4 = 0,80 mg Chf-Alk-(2:1)-Extrakt A.
- 5 = 0,05 mg Subst. A-Rohkonzentrat aus dem Chf-Alk-(4:1)-Extrakt B.
- 6 = 0,05 mg Genin B.
- 7 = 0,05 mg Genin C.
- 8 = 0,05 mg Digitoxigenin, authentisch.
- 9 = 0,05 mg Genin D.
- 10 = 0,05 mg Diginigenin, authentisch.
- 11 = 0,05 mg Genin E.
- 12 = 0,05 mg Genin F.
- 13 = 0,05 mg Gitoxigenin, authentisch.
- 14 = 0,30 mg amorphes Geningemisch aus rohem krist. Digifolein.
- 15 = 0,10 mg Genin G.

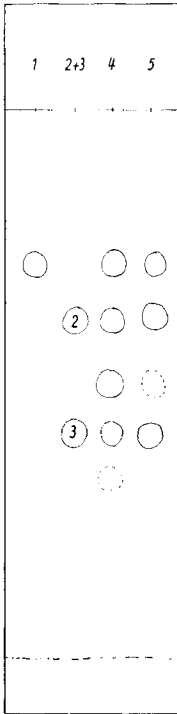
Beispiele für die Papierchromatographie der Zucker²⁵⁾.

Fig. 8.

13 Std., 22°.

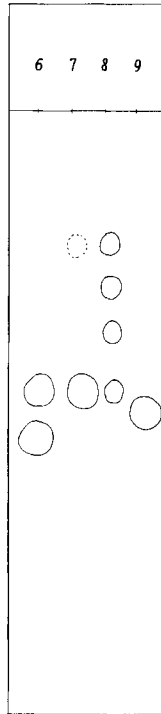


Fig. 9.

12 Std., 22°.

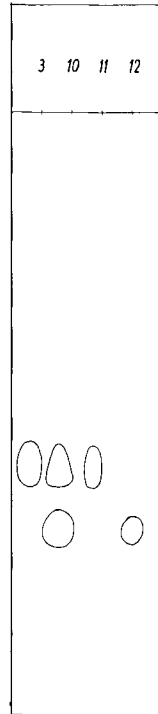


Fig. 10.

12 Std., 22°.

- 1 = 0,20 mg D-Glucose, authentisch.
 2 = 0,20 mg Digilanidobiose, authentisch. Die isolierte Digilanidobiose zeigt die genau gleiche Laufstrecke.
 3 = 0,10 mg D-Digitoxose, authentisch.
 4 = 0,30 mg Zuckersirup aus hydrolysiertem Chf-Extrakt A.
 5 = 0,30 mg Zuckersirup aus hydrolysiertem Chf-Alk-(4:1)-Extrakt A.
 6 = 0,20 mg Zuckersirup aus hydrolysiertem Ae-Extrakt B.
 7 = 0,20 mg Zuckersirup aus hydrolysiertem Chf-Extrakt B.
 8 = 0,20 mg Zuckersirup aus hydrolysiertem Chf-Alk-(4:1)-Extrakt B.
 9 = 0,10 mg D-Diginose, krist., authentisch.
 10 = 0,10 mg Destillat des rohen Zuckersirups aus milder saurer Hydrolyse von Ae-Extrakt B.
 11 = 0,10 mg Krist. D-Digitoxose aus Zuckersirup Nr. 10.
 12 = 0,10 mg D-Cymarose, authentisch.

Da die *Kedde*-Reaktion positiv ausfällt, dürfte ein digitaloides Lacton vorliegen. Nach dem Rf-Wert könnte es sich um eines der Anhydrodigitoxigene handeln.

²⁵⁾ Lösungsmittelsystem n-Butanol-Pyridin-Wasser-(3:2:1,5)²⁶⁾, Entwicklung mit Anilinphtalat²⁷⁾.

²⁶⁾ E. Chargaff, C. Levine & C. Green, J. biol. Chemistry **175**, 67 (1948); A. Jeanes, C. S. Wise & R. J. Dimler, Anal. Chemistry **23**, 415 (1951).

²⁷⁾ S. M. Partridge, Nature **164**, 443 (1949).

Tabelle III. Eigenschaften der neuen krist. C₂₁-Genine (zum Vergleich die bisher bekannten krist. C₂₁-Genine).

Substanz	Smp.	[α] _D	Bruttoformel	UV.-Spektrum, λ _{max} in mμ (log ε)	IR.-Spektrum, wichtigste λ _{max} in μ	Farbreaktion		
						Raymond	Kedde	SbCl ₃ in Chloroform (19,28)
Anhydro-purogenin ²⁹⁾	228-235°	+ 8° (Me)	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	—	2,85-2,90 (O-H) 5,92-5,94 (C=O) ³⁰⁾	—	—	—
Acetyl-Derivat	unbekannt	—	—	—	—	—	—	—
Diginigenin ³¹⁾	115° ²¹⁾ 108-112° ³²⁾	- 226° (An) ³¹⁾	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	308-310 (1,95) ³²⁾ 333 36)	2,79 (O-H) ³²⁾ ³³⁾ 5,76 (C=O) 5,84 (C=O)	violett 32) ³⁵⁾	violett 32)	gelb 32)
Mono-O-acetyl-diginigenin ³¹⁾	178-180°/ 195-200° ³¹⁾	- 210° (An) ³¹⁾	C ₂₃ H ₃₀ O ₅	—	—	—	—	—
Genin B . . .	278-282° (Zers.)	+ 67,0° (Chf)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	306-308 (1,42) ³³⁾	2,90 (O-H) ³⁰⁾ 5,70 (C=O)	neg.	gelb (gelb)	gelb
Mono-O-acetylgenin B	220-280° →301-310°	+ 49,9° (Chf)	C ₂₃ H ₃₂ O ₅	ca. 306-308 ³³⁾	5,70 (C=O) 5,78 (C=O) ³⁴⁾ 8,10 (C-O-CO-)	neg.	—	gelb
Genin D . . .	284-286°/ 296-304°	- 25,4° (Chf:Me(9:1))	C ₂₁ H ₃₀₋₃₂ O ₅	304-306 (1,84) ³³⁾	2,95-3,03 (O-H) 5,74 (C=O) ³⁰⁾ 5,85 (C=O)	schwach rosa	orange- braun (gelb)	gelb
Di-O-acetylgenin D	208-215°	- 161,5° (Chf)	C ₂₅ H ₃₄₋₃₆ O ₇	303-305 (1,75) ³³⁾	2,90 (O-H) 5,74-5,79 (C=O) ³⁴⁾ 8,12 (C-O-CO-)	—	—	gelb
Genin E . . .	252-260°	- 12,6 (Me)	C ₂₁ H ₃₀₋₃₂ O ₅ (?)	—	2,92 (O-H) ³⁰⁾ 5,72 (C=O)	neg.	gelb (gelb)	gelb
Genin F . . .	238-242°	- 16,0 (Me)	C ₂₁ H ₃₄ O ₅	282-283 (1,62) ³³⁾	2,96-2,98 (O-H) ³⁰⁾ 5,91 (C=O)	neg.	gelb-orange (leuchtend gelb)	neg.
Di-O-acetylgenin F	222-228°	+ 27,9° (Chf)	C ₂₅ H ₃₈ O ₇	—	2,97-2,99 (O-H) ³⁴⁾ 5,77-5,78 (C=O) 5,91 (C=O) 8,15 (C-O-CO-)	neg.	—	—
Genin H . . .	160-162°	—	—	—	—	neg.	schwach gelb (neg.)	—

²⁹⁾ Farbe bei Tageslicht, in Klammern Fluoreszenzfarbe im UV.-Licht. ³⁰⁾ R. Tschesche & G. Grimmer, Chem. Ber. **88**, 1569 (1955).
³¹⁾ Fest in KBr gepresst. ³²⁾ C. W. Shoppee & T. Reichstein, Helv. **23**, 975 (1940). ³³⁾ Exper. Teil dieser Arbeit. ³⁴⁾ In Äthanol. ³⁵⁾ In Methylenchlorid. ³⁶⁾ Nur relativ grosse Konzentrationen ergeben diese Färbung. ³⁷⁾ An einem von Herrn H. Mrozik hergestellten Präparat bestimmt.

Genin B. Die Analysenwerte passten auf die Formel $C_{21}H_{30}O_4$. Nach dem IR.-Spektrum (vgl. Fig. 12) enthält der Stoff eine HO-Gruppe ($2,90 \mu$) und eine Carbonylgruppe ($5,70 \mu$; wahrscheinlich gesättigtes Fünfringketon). Im längerwelligen Bereich treten neben den beiden Maxima bei $9,43$ bis $9,48 \mu$ und $9,58 \mu$ ($C-O-C$?) weitere intensive Banden bei $11,29 \mu$, $11,84 \mu$ und $12,13-12,15 \mu$ auf. Ähnliche Banden werden bei α -Epoxy-ketonen gefunden³⁷⁾, so dass vielleicht eine derartige Gruppierung vorliegt. Eine Carbonylgruppe lässt auch das UV.-Spektrum (vgl. Fig. 11) erkennen, dessen einziges Maximum bei $306-308 m\mu$ auffallend langwellig ist (vgl. Diskussion). Bei den α -Epoxy-ketonen ist das schwache Maximum der Ketogruppe ebenfalls ins langwellige Gebiet verschoben³⁷⁾. Die intensive Gelbfärbung mit Tetranitromethan lässt auf eine isolierte $C=C$ -Bindung schließen. Die starke Endabsorption im UV.-Spektrum spricht auch dafür³⁸⁾.

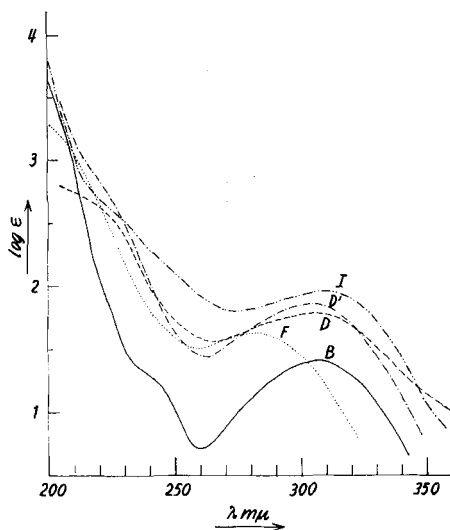


Fig. 11.

UV.-Absorptionsspektren in Alkohol*).

Kurve B = Genin B, Maximum bei $306-308 m\mu$, $\log \epsilon = 1,42$, ber. auf $C_{21}H_{30}O_4$ (346,45).

Kurve D = Genin D, Maximum bei $304-306 m\mu$, $\log \epsilon = 1,78$, ber. auf $C_{21}H_{30}O_5$ (362,45).

Kurve D' = Di-O-acetyl-genin D, Maximum bei $303-305 m\mu$, $\log \epsilon = 1,84$, ber. auf $C_{25}H_{34}O_7$ (446,52).

Kurve F = Genin F, Maximum bei $282-283 m\mu$, $\log \epsilon = 1,62$, ber. auf $C_{21}H_{34}O_5$ (366,48).

Kurve I = Diginigenin, Maximum bei $308-310 m\mu$, $\log \epsilon = 1,95$ (344,43).

Genin B liefert ein Mono-O-acetylderivat der Formel $C_{23}H_{32}O_5$, dessen IR.-Spektrum (vgl. Fig. 12) keine HO-Gruppe mehr erkennen

³⁷⁾ Vgl. *F. Sallmann & Ch. Tamm*, *Helv.* **39**, 1340 (1956).

³⁸⁾ Zur UV.-Spektroskopie von isolierten $C=C$ -Bindungen vgl. *H. P. Sigg & T. Reichstein*, *Helv.* **39**, 1507 (1956).

*) Aufgenommen von Herrn Dr. *P. Zoller* mit einem „Unicam SP 500“-Spektrophotometer.

lässt. Hingegen treten die für die Acetoxygruppe charakteristischen Maxima (5,78 μ [Acetyl C=O plus gesättigtes Ringketon] und 8,10 μ [C–O–CO–]) auf. Auch hier sind die für das freie Genin charakteristischen Banden der Fingerprint-Region deutlich sichtbar. Von den 4 Sauerstoffatomen des Genins B ist eines als acetylierbare HO-Gruppe, ein weiteres evtl. als gesättigtes Fünfringketon vorhanden.

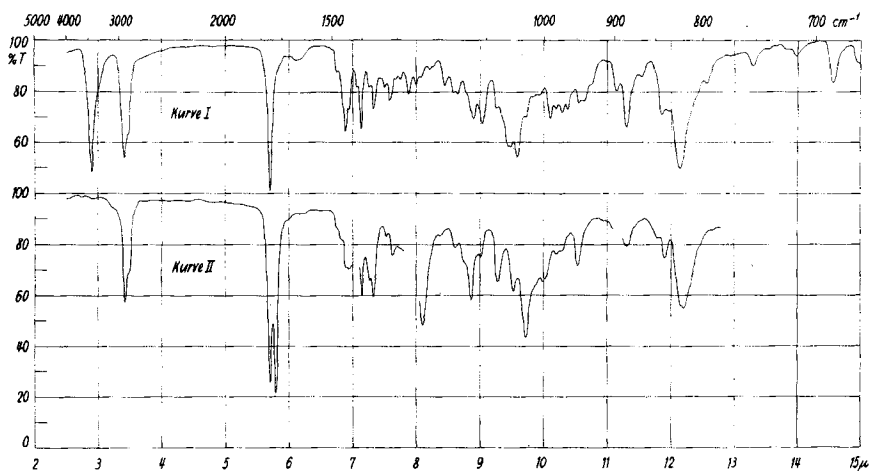


Fig. 12.

IR.-Absorptionsspektrum*).

Kurve I = Genin B, fest in KBr gepresst, kompensiert mit KBr.

Kurve II = Mono-O-acetyl-genin B, Lösung in CH_2Cl_2 , $d = 0,2 \text{ mm}$, $c = 0,056\text{-m}$.

Das dritte O-Atom steht möglicherweise in einem Oxydring, welcher der Ketogruppe benachbart ist. Die vierte Sauerstoff-Funktion dürfte ätherartig sein (vgl. Diskussion). Genin B enthält ferner eine isolierte Doppelbindung. Laufstrecke im Papierchromatogramm s. Fig. 4.

Genin C besitzt die Formel $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4$. Nach Smp., Misch-Smp., spez. Drehung, Analyse, UV.- und IR.-Spektrum, Farbreaktionen und Rf-Wert ist Genin C mit Digitoxigenin identisch.

Genin D. Die Analysenwerte des freien Genins wie auch seines Di-O-acetyl-Derivats (siehe unten) sind sowohl mit der Formel $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ als auch mit der wasserstoffreicheren Formel $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_5$ für das Genin vereinbar. Die breite Bande in der 3μ -Region des IR.-Spektrums (vgl. Fig. 13) deutet auf mehrere, evtl. assoziierte HO-Gruppen hin. Das Spektrum lässt ferner zwei Carbonylgruppen bei $5,74 \mu$ (wahrscheinlich gesättigtes Fünfringketon) und $5,84 \mu$ (gesättigtes Sechsringketon oder Aldehydgruppe) erkennen. Die für Genin B charakteristischen Banden im langwelligen Bereich fehlen vollstän-

* Aufgenommen von Herrn Dr. P. Zoller mit einem Perkin-Elmer-IR.-Spektrophotometer, Modell 21.

dig. Im UV.-Spektrum (vgl. Fig. 11) ist ein einziges Maximum, wieder relativ langwellig, bei 304–306 $m\mu$ ($\log \epsilon = 1,84$) zu sehen, dessen Intensität auf 2 Carbonylgruppen deutet. Die starke Gelbfärbung mit Tetranitromethan lässt auf eine isolierte C=C-Bindung schliessen.

Genin D gibt ein Di-O-acetyl-Derivat, dessen Analysenwerte auf die beiden Formeln $C_{25}H_{34}O_7$ und $C_{25}H_{36}O_7$ passen. Nach dem IR.-Spektrum (vgl. Fig. 13) besitzt der Stoff noch eine freie HO-Gruppe (2,90 μ). Die breite Bande bei 5,74–5,79 μ dürfte durch die C=O-Streckschwingung von 1–2 Acetylgruppen und der beiden gesättigten Ketone zustande kommen. Das Maximum bei 5,84 μ ist verschwunden. Möglicherweise hat eine Verschiebung nach kürzeren Wellenlängen stattgefunden. Im UV.-Spektrum ist gegenüber dem freien Genin allerdings keine Veränderung erkennbar (vgl. Fig. 11). Genin D besitzt somit 3 HO-Gruppen, von denen nur 2 acetylierbar sind³⁹), ferner zwei gesättigte Carbonylgruppen, die erstere wahrscheinlich in einem Fünfring, die letztere in einem Sechsring oder als Aldehydgruppe. Die Natur des fünften O-Atoms ist fraglich. Der Stoff besitzt ferner eine isolierte Doppelbindung. Laufstrecke im Papierchromatogramm vgl. Fig. 4, 5 und 6.

Genin E besitzt wahrscheinlich die Formel $C_{21}H_{30-32}O_5$, die aber nicht gesichert ist. Nach dem IR.-Spektrum (vgl. Fig. 14) liegen 1–2 HO-Gruppen (2,92 μ) und wahrscheinlich eine gesättigte Fünfring-Ketongruppe (5,72 μ) vor. Im langwelligen Bereich treten starke Banden in der Gegend von 9,5 μ (C–O–C?) sowie bei 11,28 μ , 11,84 μ und 12,13 μ auf, also ganz ähnlich wie bei Genin B. Demnach könnte auch in Genin E eine α -Epoxyketon-Gruppierung vorliegen. Die starke Gelbfärbung mit Tetranitromethan dürfte auf eine isolierte Doppelbindung zurückzuführen sein. Die Laufstrecke im Papierchromatogramm ist in Fig. 5 wiedergegeben. Für weitere Untersuchungen reichte die Menge nicht aus.

Genin F besitzt nach den Analysenwerten die Formel $C_{21}H_{34}O_5$. Nach dem IR.-Spektrum (vgl. Fig. 15) sind mehrere HO-Gruppen (intensive Bande bei 2,96–2,98 μ) und eine gesättigte aliphatische oder Sechsring-Ketogruppe (5,91 μ ; dieses Maximum ist auffallend langwellig) vorhanden. Die bei 9,29 μ auftretende Bande könnte durch eine C–O–C-Gruppierung bedingt sein. Im UV.-Spektrum (vgl. Fig. 11) ist ein einziges Maximum bei 282–283 $m\mu$ ($\log \epsilon = 1,63$) erkennbar, das gegenüber den Maxima der andern Genine bedeutend kurzwelliger ist. Es dürfte einer Carbonylgruppe zuzuordnen sein. Genin F gibt mit Tetranitromethan keine Gelbfärbung.

Genin F liefert ein Di-O-acetyl-Derivat $C_{25}H_{38}O_7$. Nach dem IR.-Spektrum (vgl. Fig. 15) enthält letzterer Stoff noch eine freie HO-Gruppe. Die entsprechende Bande bei 2,97–2,99 μ ist aber viel

³⁹) Die Möglichkeit einer Acetylyse lässt sich nicht *a priori* ausschliessen.

schwächer als im freien Genin. Die Acetylgruppen machen sich durch neue Banden bei $5,77-5,78 \mu$ ($C=O$) und $8,15 \mu$ ($C-O-CO-$) bemerkbar. Die $C=O$ -Streckschwingung bei $5,91 \mu$ ist ebenfalls sichtbar. Von den 5 O-Atomen des Genins F scheinen demnach 3 als HO-Gruppen vorzuliegen, von denen zwei acetylierbar sind. Das vierte O-Atom dürfte ein gesättigtes 6-Ring-Keton sein. Die Natur der fünften Sauerstoff-Funktion ist unsicher; möglicherweise ist sie ätherartig gebunden. Rf-Wert des Genins vgl. Fig. 5.

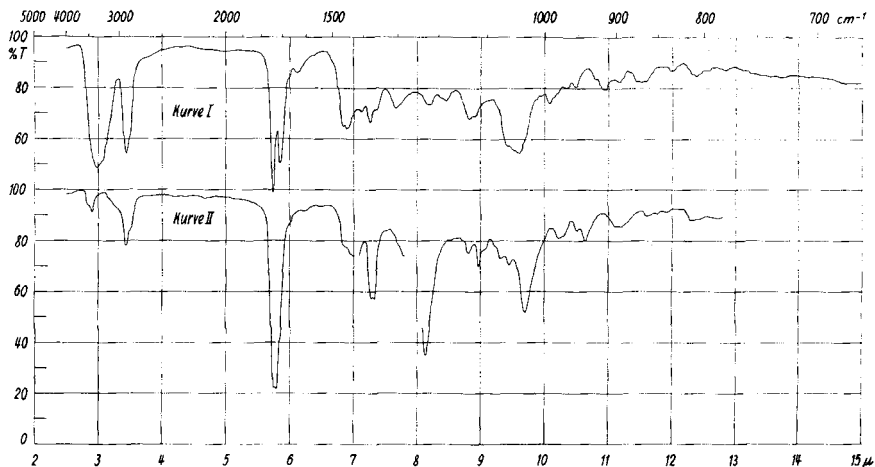


Fig. 13.

IR.-Absorptionsspektrum*).

Kurve I = Genin D, fest in KBr gepresst, kompensiert mit KBr.

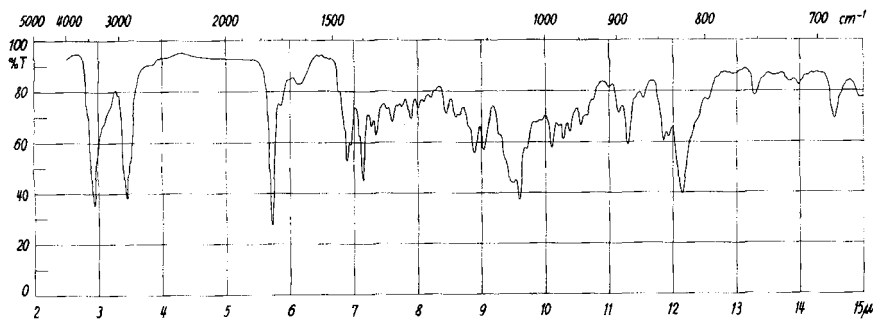
Kurve II = Di-O-acetyl-genin D, Lösung in CH_2Cl_2 , $d = 0,2 \text{ mm}$, $c = 0,038\text{-m}$.

Fig. 14.

IR.-Absorptionsspektrum*).

Genin E, fest in KBr gepresst, kompensiert mit KBr.

*) Aufgenommen von Herrn Dr. P. Zoller mit einem Perkin-Elmer-IR.-Spektrophotometer, Modell 21.

Genin G wurde nur in äusserst geringer Menge erhalten, was die Identifizierung erschwert hat. Nach Smp., Misch-Smp., IR.-Spektrum, Laufstrecke im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 7) und den Farbreaktionen mit 84-proz. H_2SO_4 sowie nach *Pesez*⁴⁰⁾ ist Genin G mit Gitoxigenin identisch.

Genin H wurde ebenfalls nur in sehr geringer Menge erhalten. Da die *Kedde*-Reaktion negativ ausfällt, dürfte kein digitaloides Lacton vorliegen.

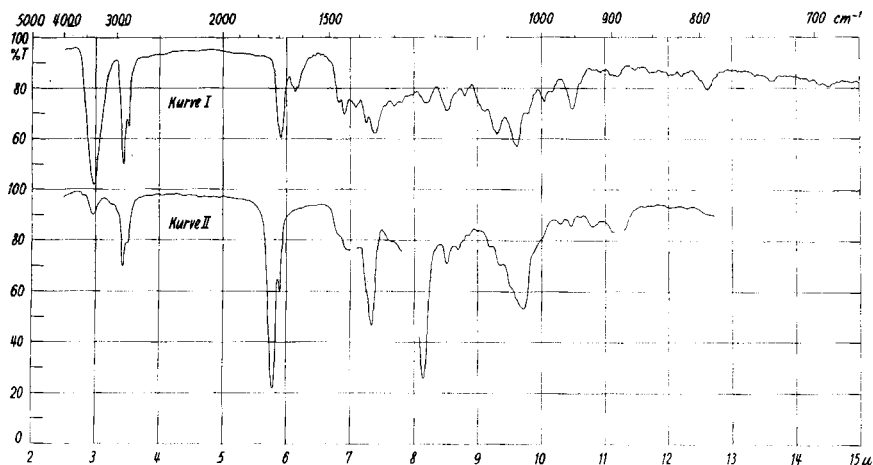


Fig. 15.

IR.-Absorptionsspektrum*).

Kurve I = Genin F, fest in KBr gepresst, kompensiert mit KBr.

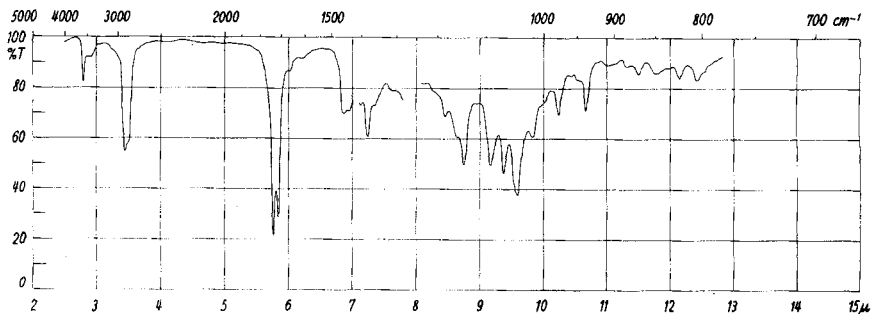
Kurve II = Di-O-acetyl-genin F, Lösung in CH_2Cl_2 , d = 0,2 mm, c = 0,036-m.

Fig. 16.

IR.-Absorptionsspektrum*).

Diginigenin, Lösung in CH_2Cl_2 , d = 0,2 mm, c = 0,085-m.

⁴⁰⁾ *M. Pesez*, *Ann. pharmac. franç.* **8**, 746 (1950).

*) Aufgenommen von Herrn Dr. *P. Zoller* mit einem *Perkin-Elmer*-IR.-Spektrophotometer, Modell 21.

D-Digitoxose wurde durch Smp., Misch-Smp., spez. Drehung und Rf-Wert (vgl. Fig. 10) mit authentischem Material identifiziert. Zur Sicherheit wurde noch das p'-Nitro-biphenyl-p-sulfonylhydrazon nach *Westphal et al.*⁴¹⁾ bereitet, das ebenfalls mit einem authentischen Derivat identisch war.

Digilanidobiose wurde durch Smp., Misch-Smp., spez. Drehung und Rf-Wert (vgl. Fig. 8) mit authentischem Material identifiziert.

Diskussion zur Konstitution der isolierten Stoffe.

Die Konstitution der Genine C und G ist durch ihre Identifizierung mit den digitaloiden Lactonen Digitoxigenin bzw. Gitoxigenin gesichert. Das gleiche gilt für die beiden isolierten Zucker. Genin A scheint ein weiteres digitaloides Lacton zu sein, das aber wegen der geringen Menge nicht identifiziert werden konnte. Über den chemischen Bau der fünf neuen Genine B, D, E, F und H konnten folgende Anhaltspunkte gewonnen werden: Sie alle geben mit *Raymond*- oder *Kedde*-Reagens keine oder nur eine äusserst schwache Färbung. Mit SbCl_3 in Chloroform treten schon mit kleineren Mengen charakteristische Färbungen auf, die auch im UV.-Licht erkennbar sind. Damit können diese Stoffe im Papierchromatogramm leicht sichtbar gemacht werden. Auf Grund von diesem Verhalten, nach den UV.- und IR.-Spektren sowie nach den Analysenresultaten der freien Genine und ihrer Acetylderivate liegen sicher keine digitaloiden Lactone vor, sondern Genine der sog. C_{21} -Gruppe. Der Hauptvertreter dieser Gruppe ist das Diginigenin³¹⁾, das aus dem erstmals von *W. Karrer*⁴²⁾ aus den Blättern von *Digitalis purpurea* isolierten Diginin durch milde saure Hydrolyse erhalten wird. *Tschesche & Grimmer*²⁹⁾ erhielten bei der sauren Hydrolyse des Digipurpurins (auch aus Blättern von *D. purpurea* isoliert) neben 3 Mol D-Digitoxose das krist. Anhydro-purpurogenin mit der Formel $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$. Dies sind die beiden einzigen bisher beschriebenen krist. Genine dieser Gruppe⁴³⁾ ⁴⁴⁾ ^{44a)}. Aus

⁴¹⁾ *O. Westphal, H. Feier, O. Lüderitz & I. Fromme*, *Biochem. Z.* **326**, 139 (1954).

⁴²⁾ *W. Karrer*, Festschrift für *E. Borell*, Basel 1946, S. 238.

⁴³⁾ *Tschesche & Grimmer*²⁹⁾ isolierten aus den Blättern von *D. purpurea* und *D. lanata* neben Digipurpurin noch Digifolein, das bei der sauren Hydrolyse D-Diginose und das amorphe Digifolgenin lieferte. Für Digifoleigenin lässt sich die Formel $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$ ausrechnen. Bei der Wiederholung der milden sauren Hydrolyse mit einem rohen Digifolein-Präparat der Fa. *F. Hoffmann-La Roche A.G.*, Basel, wurde kein krist. Genin erhalten. Das amorphe Geningemisch zeigte im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 6) mehrere Flecke, deren Rf-Werte von den Werten der von uns isolierten Genine abwichen. Es zeigte sich nachträglich, dass das verwendete Digifolein-Präparat ein Gemisch von Diginin und Digifolein ist. (Privatmitteilung von Herrn P. D. Dr. *O. Schindler*.)

⁴⁴⁾ Die Genine der herzwirkenden Glykoside, die *Stoll & Renz*³⁾ kürzlich beschrieben haben, nämlich DA 7 aus *Digitalis grandiflora*, DF 1 und DF 2 aus *D. ferruginea* und DM 11 aus *D. mariana* sind nicht bekannt. Anm. bei der Korrektur: *Tschesche & Buschauer*^{44a)} isolierten aus *D. lanata* ein weiteres herzwirkendes Glykosid, das Lanafolein. Sein Genin, Lanafolgenin ($\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_5$), wurde nicht kristallisiert erhalten.

^{44a)} *B. Tschesche & G. Buschauer*, *Liebigs Ann. Chem.* **603**, 59 (1957).

Tab. III geht eindeutig hervor, dass die von uns isolierten Genine B, D, E, F und H von diesen bekannten Geninen verschieden sind. Strukturell dürften alle diese Stoffe miteinander verwandt sein. Diese Verwandtschaft geht auch aus dem Vergleich der chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Genine mit denjenigen des Diginigenins hervor. Besonders auffallend ist, dass das Absorptionsmaximum des Diginigenins bei 308–310 $m\mu$ (vgl. Fig. 11) im gleichen langwelligeren Bereich wie das der Genine B und D auftritt⁴⁵). Trotz umfangreichen Untersuchungen^{31)44a)46)46a)} ist die Konstitution des Diginigenins nicht als gesichert zu betrachten. Die geringen Mengen der neu isolierten Genine erlaubten es nicht, die allgemeinen Kenntnisse über die C₂₁-Genine zu vertiefen.

Die Isolierung von Digilandidobiose nach der milden sauren Hydrolyse von Rohextrakten aus nichtfermentierten Blättern und der D-Digitoxose aus den Hydrolysaten, die aus fermentierten Blättern stammen, findet eine Parallele in den herzwirksamen Purpurea-Glykosiden A und B bzw. den Lanatosiden A, B und C. Demnach dürfte ein Teil der leicht spaltbaren Glykoside, die sich von den C₂₁-Geninen ableiten, in der Pflanze ursprünglich als Tetraglykoside (aus 3 Mol D-Digitoxose und 1 Mol D-Glucose) enthalten sein. Durch die Blattenzyme werden sie zu den Triglykosiden (aus 3 Mol D-Digitoxose) abgebaut. In den Papierchromatogrammen der wasserlöslichen Anteile der Hydrolysate war oft noch ein weiterer Fleck sichtbar. Der entsprechende Zucker kristallisierte bisher nicht. Nach dem Rf-Wert liegt entweder ein 2-Desoxy-hexamethylöse-3-methyläther (am ehesten Cymarose oder Diginose) oder ein während der Aufarbeitung entstandenes Derivat der Digitoxose vor.

Herrn Prof. T. Reichstein danken wir für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Der eine von uns (R. R.) möchte auch an dieser Stelle der Stiftung „Boris Kidrič“ der slowenischen Regierung (Jugoslawien) für ein Stipendium danken, das ihm die Ausführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Dem „Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung“ sei ebenfalls für die Unterstützung dieser Arbeit bestens gedankt.

Experimenteller Teil.

Alle Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Drehung wurden 1 Std. bei 0,05 Torr und 70° und zur Analyse 5 Std. (Acetylderivate 3 Std.) bei 0,01 Torr und 100° über P₂O₅ getrocknet, sofern nichts anderes angegeben ist. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chf oder Chf-Ae. (1:3), Waschen mit 2-n. HCl, 2-n. Na₂CO₃ und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum. Ausführung der Tüpfelreaktion auf Papier mit Raymond-Reagens²⁰),

⁴⁵) Zu den IR.-Spektren vgl. auch die von Stoll & Renz³⁾ publizierten Spektren der von ihnen isolierten herzunwirksamen Glykoside.

⁴⁶) C. W. Shoppee, Helv. **27**, 246, 426 (1944).

^{46a}) J. Press & T. Reichstein, Helv. **30**, 2127 (1947).

Kedde-Reagens²¹), Trichloressigsäure (25-proz. Lösung in Chf)²²) und SbCl_3 (20-proz. Lösung in Chf)²⁴), sowie der *Keller-Kiliani*-Reaktion⁴⁷), der Zuckerprüfung⁴⁸), der Papierchromatographie von Glykosiden und Aglykonen^{20) 49) 50) 51}), von Zuckern^{26) 27}), der Adsorptionschromatographie nach dem Durchlaufverfahren⁵²) an alkalifreiem Al_2O_3 ⁵³) nach früheren Angaben. Es gelten die folgenden Abkürzungen: Alk = Äthanol, Ae = Äther, An = Aceton, Be = Benzol, Bu = n.-Butanol, Chf = Chloroform, Me = Methanol, Pe = Petroläther, Pgl = Propylenglykol, THF = Tetrahydrofuran, To = Toluol, W = Wasser. Verhältniszahlen bedeuten immer das Verhältnis der Volumina.

Extraktion der Blätter.

1. Ohne Fermentierung, 500 g an der Luft und im Trockenschrank bei max. 40° getrocknete und gemahlene Blätter wurden mit 3 l Alk 10 Min. zum Sieden erhitzt und hierauf 30 Min. auf 95° gehalten. Nach Erkalten wurde durch eine gewaschene Schicht von *Hyflo Super Cel* genutscht, der pflanzliche Rückstand mit 3 l 75-proz. Alk wie oben behandelt und diese Operation mit 2 weiteren Portionen von je 3 l 50-proz. Alk wiederholt. Der Rückstand auf der Nutsche wurde gründlich mit Alk und 50-proz. Alk nachgewaschen. Das Blattpulver schmeckte nicht mehr bitter und wurde verworfen. Die vereinigten Filtrate (grünbraun gefärbt) wurden im Vakuum bei 40–45° auf 500 cm³ eingengt, mit 500 cm³ frischem Alk versetzt und zweimal mit je 500 cm³ Pe ausgeschüttelt. Die mit 100 cm³ 50-proz. Alk gewaschenen Pe-Lösungen wurden im Vakuum vollständig eingedampft und ergaben 11,85 g Pe-Extrakt A. Die wässrig-alkoholischen Lösungen wurden mit $\text{Pb}(\text{OH})_2$, bereitet aus 1 kg Pb -Diacetat-trihydrat, 20 Min. geschüttelt und durch eine Schicht von *Hyflo Super Cel* filtriert. Das klare Filtrat wurde im Vakuum vom Alk befreit und auf 500 cm³ eingengt, wobei das pH auf 6 gehalten wurde. Hierauf wurde nacheinander je viermal mit je 300 cm³ Ae, Chf, je fünfmal mit je 300 cm³ Chf-Alk-(4:1) und Chf-Alk-(2:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge passierten 2 Scheidetrichter mit je 30 cm³ Wasser, einen mit 30 cm³ 2-n. Na_2CO_3 und 2 mit je 30 cm³ Wasser, wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Die bei den Ausschüttelungen entstandenen Emulsionen wurden durch Zentrifugieren getrennt. Es resultierten: 1,05 g Ae-Extrakt A, 1,35 g Chf-Extrakt A, 0,95 g Chf-Alk-(4:1)-Extrakt A und 2,85 g Chf-Alk-(2:1)-Extrakt A.

2. Mit Fermentierung, 2,30 kg getrocknete und gemahlene Blätter (wie oben beschrieben) wurden mit 2 l Wasser angeteigt und nach Zugabe von 10 cm³ Toluol 24 Std. bei 40° stehengelassen. Hierauf wurde abgenutscht und der Blattrückstand mit 5 l 50-proz. Alk, dreimal mit je 3 l 70-proz. Alk und dreimal mit je 3 l 95-proz. Alk bei 30–40° extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden wie oben beschrieben im Vakuum stark eingengt, analog mit Pe ausgeschüttelt, mit $\text{Pb}(\text{OH})_2$ gereinigt und die nach Eindampfen erhaltene wässrige Lösung analog fraktioniert ausgeschüttelt. Es resultierten: 29,32 g Pe-Extrakt B, 5,127 g Ae-Extrakt B, 3,790 g Chf-Extrakt B, 4,057 g Chf-Alk-(4:1)-Extrakt B und 6,020 g Chf-Alk-(2:1)-Extrakt B.

Untersuchung der Rohextrakte.

Ae-Extrakt A: 669 mg Ae-Extrakt A wurden an 20 g Al_2O_3 chromatographiert. Die Hauptmenge des Materials wurde mit Be-Chf-(4:1), (1:1), Chf und Chf-Me-(95:5) und (9:1) eluiert. Keine der Fraktionen kristallisierte bisher. Sie enthielten alle harzartiges grüngefärbtes Material, das die Entwicklung der Papierchromatogramme mit *Raymond*-oder *Kedde*-Reagens sehr erschwerte.

⁴⁷) J. v. Euw & T. Reichstein, *Helv.* **31**, 883 (1948).

⁴⁸) P. R. O. Bally, K. Mohr & T. Reichstein, *Helv.* **34**, 1750 (1951).

⁴⁹) H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein, *Helv.* **36**, 357 (1953).

⁵⁰) E. Schenker, A. Hunger & T. Reichstein, *Helv.* **37**, 680 (1954).

⁵¹) F. Kaiser, *Chem. Ber.* **88**, 556 (1955).

⁵²) T. Reichstein & C. W. Shoppee, *Disc. Farad. Soc.*, Nr. **7**, 305 (1949).

⁵³) Bereitet nach J. v. Euw, A. Lardon & T. Reichstein, *Helv.* **27**, 1292 (1944), Fussnote ²), aber bei 180–190° reaktiviert.

Chf-Extrakt A: 1. *Chromatographie an Al_2O_3* : 536 mg Rohextrakt wurden an 15 g Al_2O_3 chromatographiert, doch kristallisierte keine der Fraktionen. Sie zeigten ähnliche Eigenschaften wie diejenigen des Ae-Extrakts A.

2. *Acetylierung*. 441 mg Rohextrakt wurden mit 5 cm³ abs. Pyridin und 4 cm³ Acetanhydrid 48 Std. bei 22° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung mit Chf ergab 537 mg Rohprodukt. Es wurde an 16 g Al_2O_3 chromatographiert. Die Hauptmenge des Materials wurde mit Be und Be-Chf-(99:1) eluiert. Die *Kedde*-Reaktion war in diesen Fraktionen negativ. Keine von ihnen kristallisierte bisher.

3. *Milde saure Hydrolyse*. 428 mg Rohextrakt wurden mit 25 cm³ Me und 25 cm³ 0,1-n. H_2SO_4 25 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Entfernen des Me im Vakuum wurde die wässrige Lösung 1 Std. auf 60° erwärmt. Nach Abkühlen wurde wie üblich⁵⁴) mit Chf-Ae-(1:3) gründlich ausgeschüttelt, diese Auszüge zweimal mit Wasser, einmal mit 2-n. Na_2CO_3 -Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 111 mg (26%) Chf-Ae-(1:3)-Extrakt. Die saure wässrige Phase und die zwei ersten Waschwasser wurden vereinigt und dienten zur Isolierung der Zucker (siehe unten). — Der Chf-Ae-(1:3)-Extrakt (111 mg) wurde an 3 g Al_2O_3 chromatographiert.

Die Fraktionen 1—9 (eluiert mit Be-Pe-(9:1) und Be) lieferten 6,1 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 10—18 (16,7 mg, eluiert mit Be-Chf-(99:1)) gaben aus Me-Ae ca. 2 mg rohes Genin B vom Smp. 260—276°. Die *Kedde*-Reaktion ist bei diesen Kristallen negativ, bei den amorphen Mutterlaugen jedoch positiv.

Die Fraktionen 19—22 (eluiert mit Be-Chf-(99:1) und (98:2)) gaben 3,4 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 23—28 (29,0 mg, eluiert mit Be-Chf-(95:5), (9:1), (8:2) und (1:1)) gaben aus Me-Ae 13,3 mg rohes Genin C (= Digitoxigenin) vom Smp. 230—256°.

Die Fraktionen 29—31 (eluiert mit Chf) gaben 19,3 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 32—35 (10,9 mg, eluiert mit Chf-Me-(9:1) und (8:2)) gaben aus Me-Ae 4,2 mg rohes Genin G (= Gitoxigenin?) vom Smp. 230—250°.

Isolierung der Zucker: Die oben erwähnte saure wässrige Lösung wurde vom Chf und Ae im Vakuum befreit, mit frisch gefälltem $BaCO_3$ neutralisiert, durch ein mit gewaschenem $BaCO_3$ gedichtetes Filter filtriert, mit einer Spur $BaCO_3$ versetzt, im Vakuum bei maximal 40° vollständig eingedampft, in wenig Wasser aufgenommen, filtriert und eingedampft. Es resultierten 271 mg (63%) roher Zuckersirup. Im Papierchromatogramm sind 4—5 Flecke sichtbar (vgl. Fig. 8). Aus Me kristallisierten 23 mg rohe Digilanidobiose vom Smp. 220—228°.

Chf-Alk-(4:1)-Extrakt A. 1. *Acetylierung*. 437 mg Rohextrakt wurden wie beim Chf-Extrakt A beschrieben, acetyliert. Es resultierten 548 mg Rohprodukt, die an Al_2O_3 chromatographiert wurden. Die eine Hälfte des Materials wurde mit Be-Pe-(9:1), die andere Hälfte mit Be-Chf-(1:1) eluiert. Die leichter eluierbaren Fraktionen gaben mit *Kedde*-Reagens eine schwache Rosafärbung, die späteren Fraktionen eine intensive Blaufärbung. Die Fraktionen kristallisierten bisher nicht.

2. *Milde saure Hydrolyse*. 226 mg Rohextrakt wurden wie beim Chf-Extrakt A beschrieben mit 0,05-n. H_2SO_4 -Me-(1:1) hydrolysiert. Die analoge Aufarbeitung gab 60 mg (26,5%) Chf-Ae-(1:3)-Extrakt, die an 2 g Al_2O_3 chromatographiert wurden. Die mit Be-Chf-(95:5) eluierten Fraktionen gaben Spuren von Kristallen vom Smp. 230—280°, die nicht identifiziert werden konnten. Die mit Chf und Chf-Me-(9:1) eluierten Fraktionen gaben Spuren Kristalle vom Smp. 220—240°, die nach dem Papierchromatogramm höchstwahrscheinlich mit Genin G identisch sind. — Die Aufarbeitung der wässrigen sauren Lösungen ergab 144 mg (64%) rohen Zuckersirup. Im Papierchromatogramm sind 3—4 Flecke sichtbar (vgl. Fig. 8). Aus Me kristallisierten 19 mg rohe Digilanidobiose vom Smp. 218—224°.

Chf-Alk-(2:1)-Extrakt A: wurde noch nicht weiter untersucht.

⁵⁴) S. Rangaswami & T. Reichstein, Helv. 32, 939 (1949).

Table IV.

Fraktionsnummer	Lösungsmittel	Eindampfrückstand				Bezeichnung
		Rohprodukt in mg	Rohkristalle aus Me-Ac			
			Smp.	Kedde-Reagens	Farbreaktion mit SbCl ₃ ²⁸⁾	
1	Be	6,6	neg.	neg.	Genin B	
2	Be-Chf-(99:1)	33,5	neg.	neg.	Genin C = Digitoxigenin	
3-5	Be-Chf-(99:1)	285,0	neg.	gelb (gelb)	nicht identifiziert	
6-8	Be-Chf-(99:1)	135,6	blau	grün (grün-gelb)		
9 und 10	Be-Chf-(99:1)	81,7				
11	Be-Chf-(98:2)	41,7	blau	grün (grün-gelb)		
12-17	Be-Chf-(98:2), (95:5), (9:1), (4:1), (1:1)	103,0				
18-20	Be-Chf-(1:1)	206,8	schwach rosa	braun (gelb)	Genin D	
21-24	Be-Chf-(1:1)	79,4	neg.	gelb (gelb)	Genin E	
25-29	Chf, Chf-Me-(99:1), (98:2), (9:1) u. (1:1)	149,1				

Table V.

Fraktionsnummer	Lösungsmittel	Eindampfrückstand				Bezeichnung
		Rohprodukt in mg	Rohkristalle aus Me-Ac			
			Smp.	Kedde-Reagens	Farbreaktion mit SbCl ₃ ²⁸⁾	
1-3	Be	26,4			Genin B	
5 und 6	Be-Chf-(99:1)	21,9	neg.	gelb (gelb)	Genin C = Digitoxigenin	
7-9	Be-Chf-(98:2), (95:5)	38,9	blau	grün (grün-gelb)	Genin D	
10-12	Be-Chf-(9:1)	61,3				
13-15	Be-Chf-(4:1), (1:1)	55,6	schwach rosa	braun (gelb)		
16-19	Be-Chf-(1:1)	93,1				
20-26	Be-Chf-(1:1), Chf, Chf-Me-(99:1), (99:2)	52,2	neg.	gelb bis orange (gelb)	Genin F	
27-29	Chf-Me-(95:5)	91,4				
30-34	Chf-Me-(9:1), (4:1), (1:1)	46,9				

Ae-Extrakt B. *Milde saure Hydrolyse*. 3,565 g Rohextrakt wurden wie beim Chf-Extrakt A beschrieben, mit 0,05-n. H_2SO_4 -Me-(1:1) hydrolysiert. Es resultierten 1,295 g (36%) Chf-Ae-(1:3)-Extrakt, die an 40 g Al_2O_3 chromatographiert wurden. Über das Resultat orientiert Tab. IV.

Weitere Reaktionen der isolierten Genine sind weiter unten bei der Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Stoffe beschrieben.

Die Aufarbeitung der wässrigen, sauren, zuckerhaltigen Lösungen ergab 2,077 g (58%) rohen Zuckersirup. Eine Probe von 913 mg wurde im Molekularkolben bei 0,05 Torr bis 95° Badtemperatur erhitzt. Bei 60—70° Badtemperatur wurden 218 mg gelb gefärbtes Destillat erhalten, das nochmals gleich destilliert wurde. Es resultierten 100 mg farbloser Sirup, der im Papierchromatogramm 2 Flecke zeigte (vgl. Fig. 9). Aus An-Ae kristallisierten 58 mg rohe D-Digitoxose vom Smp. 105—110°.

Die Destillationsrückstände wurden nicht weiter untersucht.

Chf-Extrakt B. 1. *Chromatographie an Al_2O_3* . 1,00 g Rohextrakt wurden an 30 g Al_2O_3 chromatographiert. Keine der Fraktionen kristallisierte bisher. Die mit Be-Chf-(1:1) und Chf-Me-(9:1) und —(8:2) eluierten Fraktionen gaben eine sehr intensive blaue Raymond-Reaktion.

2. *Milde saure Hydrolyse*. 2,37 g Rohextrakt wurden wie beim Chf-Extrakt A beschrieben mit 0,05-n. H_2SO_4 -Me-(1:1) hydrolysiert. Die analoge Aufarbeitung ergab 577 mg (24,4%) Chf-Ae-(1:3)-Extrakt, die an 17 g Al_2O_3 chromatographiert wurden. Das Resultat ist aus Tab. V ersichtlich.

Weitere Reaktionen und Eigenschaften der isolierten Genine siehe weiter unten. Die Aufarbeitung der wässrigen, sauren, zuckerhaltigen Lösungen ergab 1,272 g (53,5%) rohen Zuckersirup. Im Papierchromatogramm sind 1—2 Flecke sichtbar (vgl. Fig. 9). Die Destillation einer Probe von 350 mg bei 0,05 Torr ergab bei 60—70° Badtemperatur 80 mg gelb gefärbtes Destillat. Nach nochmaliger Destillation 40 mg farbloser Zuckersirup, der aus An-Ae 18 mg rohe D-Digitoxose vom Smp. 102—106° lieferte. Die Destillationsrückstände wurden nicht untersucht.

Chf-Alk-(4:1)-Extrakt B. *Milde saure Hydrolyse; 1. Versuch*. 2,205 g Rohextrakt wurden wie beim Chf-Extrakt A beschrieben mit 0,05-n. H_2SO_4 -Me-(1:1) hydrolysiert. Die analoge Aufarbeitung ergab bei der Ausschüttelung mit Chf-Ae-(1:3) hartnäckige Emulsionen, die auch durch Zentrifugieren nicht verschwanden und eine saubere Trennung in organische und wässrige Phase verhinderten. Ausserdem bildete sich zwischen den Phasen eine Schicht, die separat abgetrennt wurde (als „Zwischenschicht“ bezeichnet). Die noch trüben Chf-Ae-(1:3)-Auszüge gaben nach Eindampfen 354 mg Rohprodukt, das dreimal bei 22° mit 50 cm³ Äthylacetat ausgezogen wurde. Es resultierten nach Eindampfen 193 mg „Äthylacetat-lösliches Material“ und 161 mg „Äthylacetat-unlösliches Material“. (Weitere Verarbeitung siehe unten.) Das „Äthylacetat-lösliche Material“ (193 mg) wurde an 6 g Al_2O_3 chromatographiert.

Die Fraktionen 1—3 (10,2 mg, eluiert mit Be und Be-Chf-(99:1)) gaben aus Ae-Pe 8,7 mg rohes Genin H vom Smp. 162—164°.

Die Fraktionen 4—10 (eluiert mit Be-Chf-(99:1) bis (4:1)) gaben 18,5 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 11—13 (33,4 mg, eluiert mit Be-Chf-(4:1)) gaben aus Me-Ae 26 mg rohes Genin C (= Digitoxigenin) vom Smp. 240—250°.

Die Fraktionen 14—17 (eluiert mit Be-Chf-(1:1) und Chf) gaben 23,1 mg amorphes Material.

Fraktion 18 (11,7 mg, eluiert mit Chf) gab aus Me-Ae 7,2 mg Genin D vom Smp. 286°/300—304°.

Die Fraktionen 19—26 (eluiert mit Chf-Me-Gemischen von steigendem Me-Gehalt) gaben 23,1 mg amorphes Material.

Das „Äthylacetat-unlösliche Material“ (161 mg) wurde mit dem nach Eindampfen der oben erwähnten Zwischenschicht erhaltenen Material (185 mg) vereinigt und an Al_2O_3 chromatographiert, doch konnten bisher keine Kristalle erhalten werden. Die Hauptmenge liess sich erst mit Me-Chf-Äthylacetat-(1:1:1) + 2% Eisessig eluieren.

Die saure wässrige Phase, die nach Abtrennung der Chf-Ae-(1:3)-Phasen und der „Zwischenschicht“ verblieb, zeigte noch eine deutlich positive *Raymond*-Reaktion. Sie wurde deshalb viermal mit je etwa der gleichen Menge Chf-Alk-(2:1) ausgeschüttelt. Die mit wenig Wasser gewaschenen Auszüge gaben nach Trocknen und Eindampfen 326 mg Rückstand. Er wurde an Silicagel chromatographiert, doch wurden keine Kristalle erhalten. Die Hauptfraktionen wurden deshalb vereinigt, wie üblich acetyliert und das Rohprodukt an Al_2O_3 chromatographiert. Es wurden keine Kristalle erhalten. Die Hauptfraktionen gaben zwar eine positive (blaue) *Raymond*-Reaktion, zeigten aber im Papierchromatogramm jeweils mehrere Flecke. Die obige, nach der Ausschüttelung mit Chf-Alk-(2:1) verbliebene saure, wässrige Lösung und das Waschwasser wurden vereinigt und gaben nach der üblichen Aufarbeitung 355 mg rohen Zuckersirup. Er wurde in Me aufgenommen und filtriert. Es resultierten 290 mg methanollösliche Anteile, die nicht weiter untersucht wurden. Im Papierchromatogramm (vgl. Nr. 8 in Fig. 9) waren 4 Flecke sichtbar.

2. *Versuch*. 1,552 g Rohextrakt wurden wie beschrieben hydrolysiert. Die nach Entfernen des Me und der Nachhydrolyse verbleibende wässrige Phase wurde statt mit Chf-Ae-(1:3) mit Chf-Alk-(2:1) ausgeschüttelt. Es traten auch hier Emulsionen auf, die sich durch Zentrifugieren aber glatt trennen liessen. Die wie üblich gewaschenen und getrockneten Chf-Alk-(2:1)-Auszüge ergaben nach Eindampfen einen honigartigen Rückstand, der mehrmals bei 22° mit Chf-Ae-(1:3) extrahiert wurde. Es resultierten 167 mg „Chf-Ae-(1:3)-lösliche Anteile“ und 464 mg „Chf-Ae-(1:3)-unlösliche Anteile“ (Verarbeitung siehe weiter unten). Die „Chf-Ae-(1:3)-löslichen Anteile“ (167 mg) wurden an 5 g Al_2O_3 chromatographiert.

Die Fraktionen 1–2 (eluiert mit Be) gaben 0,5 mg amorphes Material, das im Papierchromatogramm einen wie Genin H wandernden Fleck zeigte.

Die Fraktionen 3–5 (eluiert mit Be-Chf-(95:5)) gaben 9,8 mg amorphes Material. *Raymond*-Reaktion rosa. Im Papierchromatogramm nur Fleck A sichtbar (vgl. Fig. 3).

Die Fraktionen 6–8 (27,4 mg, eluiert mit Be-Chf-(9:1)) gaben aus Me-Ae 16,4 mg rohes Genin C (= Digitoxigenin) vom Smp. 240–250°.

Die Fraktionen 9–12 (eluiert mit Be-Chf-(4:1) und (1:1)) gaben 26 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 13 und 14 (17 mg, eluiert mit Chf) gaben aus Me 6,0 mg rohes Genin D vom Smp. 298–304°.

Die Fraktionen 15–20 (eluiert mit Chf-Me-Gemischen) gaben 27 mg amorphes Material.

Die Mutterlaugen der Fraktionen 6–15 zeigten eine stark positive (blaue) *Raymond*-Reaktion; sie lieferten aber keine Kristalle mehr.

Die obigen „Chf-Ae-(1:3)-unlöslichen Anteile“ (464 mg) wurden wie üblich acetyliert und an Al_2O_3 chromatographiert. Es konnten keine Kristalle gewonnen werden. Im Papierchromatogramm waren mindestens fünf verschiedene Stoffe, die mit SbCl_3 im UV.-Licht eine leuchtend blaue Fluoreszenz zeigten, nachweisbar. Auch die *Kedde*- bzw. *Raymond*-Reaktion fiel in diesen Fraktionen stark positiv aus.

Die saure, wässrige Lösung, welche die Zucker enthält, wurde nicht weiter untersucht.

Der Chf-Alk-(2:1)-Extrakt B wurde noch nicht untersucht.

Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Stoffe.

Substanz A wurde nur als amorphes Konzentrat erhalten (in papierchromatographisch reiner Form nur aus den Chf-Ae-(1:3)-löslichen Anteilen des hydrolysierten Chf-Alk-(4:1)-Extrakts B (vgl. Fig. 3). *Raymond*-Reaktion: rosa; *Kedde*-Reaktion: intensiv blau. Mit SbCl_3 keine Färbung. Laufstrecke im Papierchromatogramm vgl. Fig. 3.

Genin B: Nach Umkristallisieren der Rohkristalle aus Be und Me-Chf-Ae Säulen in Büscheln vom Smp. 278–282° (Zers.); $[\alpha]_D^{25} = +67,00 \pm 1,5^{\circ}$ (c = 1,423 in Chf).

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$	Ber. C 72,80	H 8,73	O 18,47%
(346,45)	Gef. „ 72,94	„ 8,57	„ 18,37%

UV.- und IR.-Spektrum vgl. Fig. 11 bzw. 12 und Tab. III. *Kedde*-, *Raymond*- und Farbreaktion mit SbCl_3 siehe Tab. III. In Chf-Me-Lösung mit Tetranitromethan intensive Gelbfärbung. In Me leicht, in Chf schwerer, in Ae sehr schwer löslich. Laufstrecke im Papierchromatogramm vgl. Fig. 4.

Mono-O-acetyl-genin B. 32 mg Genin B vom Smp. 278—232° (Zers.) wurden mit 1,0 cm³ abs. Pyridin und 0,8 cm³ Acetanhydrid 48 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung mit Chf-Ae-(1:3) ergab 44,5 mg Rohprodukt. Aus Chf-Ae-Pe 13 mg Kristalle, die ohne scharfen Smp. von 220—280° sublimieren. Nach Umkristallisieren aus Chf-Be-Pe rechteckige Prismen, die wieder von 220—280° sublimieren; Sublimat Smp. 301—310°; $[\alpha]_D^{25} = +49,9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,150$ in Chf). IR.-Spektrum vgl. Fig. 12, bzw. Tabelle I.

$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (388,49) Ber. C 71,10 H 8,30% Gef. C 70,95 H 8,10%

Genin C = Digitoxigenin: Nach Umkristallisieren aus Me-Ae und Chf-Ae Prismen vom Smp. 250—256°; $[\alpha]_D^{25} = +19,7^\circ \pm 1,5^\circ$ ($c = 1,310$ in Me).

$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4$ Ber. C 73,76 H 9,15 O 17,09%
(374,50) Gef. „ 73,97 „ 9,23 „ 16,85%

Misch-Smp. mit authentischem Digitoxigenin war gleich, spez. Drehung; Laufstrecke im Papierchromatogramm siehe Fig. 3. UV.-Spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 217 \mu\mu$, $\log \epsilon = 4,19$ in Alk) und das IR.-Spektrum, Farbreaktion nach *Kedde* und *Raymond* (intensiv blau), mit SbCl_3 (grün, im UV.-Licht gelb) sowie mit 84-proz. H_2SO_4 stimmten mit denjenigen von authent. Digitoxigenin überein.

Genin D: Nach Umkristallisieren aus Me-Ae Prismen vom Doppel-Smp. 284—286°/296—304° (Zers.); $[\alpha]_D^{25} = -25,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,050$ in Chf-Me-(9:1)).

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (362,45) Ber. C 69,58 H 8,34 O 22,07%
 $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (364,47) Ber. C 69,20 „ 8,85 „ 21,95%
Gef. „ 69,35 „ 8,53 „ 21,89%

UV.- und IR.-Spektrum siehe Fig. 11 bzw. 13 und Tab. III. *Kedde*-, *Raymond*- und Farbreaktion mit SbCl_3 siehe Tab. III. In Chf-Me-Lösung mit Tetranitromethan Gelbfärbung. Laufstrecke im Papierchromatogramm vgl. Fig. 4, 5 und 6.

Di-O-acetyl-genin D. 29,6 mg Genin D vom Smp. 284—286°/296—304° wurden wie bei Genin B beschrieben acetyliert. Es resultierten 35 mg Rohprodukt. Aus Ae-Pe 19,5 mg Kristalle. Nach Umkristallisieren aus Ae-Pe Nadeln vom Smp. 208—215° (bei 200° beginnt Zersetzung); $[\alpha]_D^{25} = -161,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,860$ in Chf).

$\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (446,52) Ber. C 67,24 H 7,68% Gef. C 66,90 H 7,80%
 $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_7$ (448,54) Ber. „ 66,94 „ 8,09%

UV.-Spektrum und IR.-Spektrum vgl. Fig. 11, bzw. 13, bzw. Tab. III.

Genin E: Nach Umkristallisieren aus Me-Ae Kristalle vom Smp. 252—260°; $[\alpha]_D^{25} = -12,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,650$ in Me).

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (362,45) Ber. C 69,58 H 8,34 O 22,07%
 $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (364,47) Ber. „ 69,20 „ 8,85 „ 21,95%
Gef. „ 67,60⁵⁵⁾ „ 8,13⁵⁵⁾ „ 21,98%

IR.-Spektrum siehe Fig. 14, bzw. Tab. III. *Kedde*-, *Raymond*- und Farbreaktion mit SbCl_3 siehe Tab. III. In Chf-Me-Lösung mit Tetranitromethan Gelbfärbung. Laufstrecke im Papierchromatogramm siehe Fig. 5.

Genin F: Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Me-Ae Kristalle vom Smp. 238—242°; $[\alpha]_D^{25} = -16,0^\circ \pm 1,5^\circ$ ($c = 1,390$ in Me).

$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_5$ Ber. C 68,82 H 9,35 O 21,83%
(366,48) Gef. „ 68,56 „ 9,31 „ 22,13%

UV.- und IR.-Spektrum siehe Fig. 11, bzw. 15 und Tab. III. *Kedde*-, *Raymond*- und Farbreaktion mit SbCl_3 siehe Tab. III. Mit Tetranitromethan keine Gelbfärbung. Laufstrecke im Papierchromatogramm vgl. Fig. 5. Leicht löslich in Me, schwer löslich in Be, Chf und Ae.

⁵⁵⁾ Wahrscheinlich liegt ein Analysenfehler vor. Für eine Wiederholung reichte die Substanzmenge nicht aus.

Di-O-acetyl-genin F. 21,5 mg Genin F vom Smp. 238—242° wurden wie bei Genin B beschrieben acetyliert. Es resultierten 30,5 mg Rohprodukt. Aus Be-Pe 20 mg Kristalle vom Smp. 210—220°. Nach Umkristallisieren aus Be-Pe Prismen vom Smp. 222—228° (210° Beginn der Zersetzung); $[\alpha]_D^{22} = +27,9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,900$ in Chf).

$C_{25}H_{38}O_7$ (450,55) Ber. C 66,64 H 8,50% Gef. C 66,14; 66,15 H 8,29; 8,30%

UV.- und IR.-Spektrum vgl. Fig. 11, bzw. Fig. 15 und Tab. III.

Genin G = Gitoxigenin: Nach Umkristallisieren aus Me-Ae Kristalle vom Smp. 230—236°. Misch-Smp. mit authentischem Gitoxigenin vom Smp. 232—240°; 230—238°. Farbreaktion mit 84-proz. H_2SO_4 , Farbreaktion auf Hydroxylgruppen an C-16 nach *Pesez*⁴⁰), Laufstrecke im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 7) sind gleich wie bei authentischem Gitoxigenin.

Genin H: Nach Umkristallisieren aus Be-Pe hexagonale Tafeln vom Smp. 160—162°. *Kedde*-, *Raymond*- und Farbreaktion mit $SbCl_5$ siehe Tab. III. In Be leicht löslich.

D-Digitoxose: Nach zweimaligem Umkristallisieren aus An-Ae Kristalle vom Smp. 104—114°; $[\alpha]_D^{22} = +28,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,020$ in Me); $[\alpha]_D^{22} = +46,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,950$ in W, Endwert) (1 Std. bei 30° bei 0,02 Torr getrocknet). Authentische *D*-Digitoxose vom Smp. 106—115° zeigte $[\alpha]_D^{22} = +34,0^\circ \pm 1,5^\circ$ ($c = 1,76$ in Me) (Trocknung wie oben⁵⁶). Die Mischprobe schmolz bei 104—114°. Rf-Wert stimmte ebenfalls mit authent. *D*-Digitoxose überein (vgl. Fig. 8 und 10).

p'-Nitro-biphenyl-*p*-sulfonyl-hydrazon. 10 mg *D*-Digitoxose wurden nach *Westphal* et al.⁴¹) mit 16,0 mg *p'*-Nitro-biphenyl-*p*-sulfonyl-hydrazid und 0,3 cm³ Acetonitril 15 Min. auf 80° erwärmt. Nach Abdampfen 17,5 mg Kristalle vom Smp. 138—142°. Nach Umkristallisieren aus Me-Ae reine Kristalle vom Smp. 133—139°. Misch-Smp. mit Derivat aus authent. *D*-Digitoxose vom Smp. 132—138°; 133—140°.

Digilanidobiose: Nach Umkristallisieren aus Me-W Kristalle vom Smp. 224—230°; $[\alpha]_D^{24} = +32,6^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,550$ in W). Misch-Smp. mit authent. Digilanidobiose⁵⁷) gleich⁵⁸). Der Rf-Wert war ebenfalls gleich (vgl. Fig. 8 und 10).

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts (Leitung *E. Thommen*) durchgeführt.

Zusammenfassung.

Versuche, aus den Blättern von *Digitalis grandiflora* *Miller* (= *Digitalis ambigua* *Murray*) krist. Glykoside zu gewinnen, schlugen fehl. Hingegen liessen sich nach milder saurer Hydrolyse der Rohextrakte die beiden digitaloiden Lactone Digitoxigenin (= Genin C) (Hauptmenge) und Gitoxigenin (= Genin G) (Spur) sowie die fünf neuen Genine B, D, E, F und H in Kristallen fassen. Aus den wasserlöslichen Anteilen dieser Hydrolysate wurden *D*-Digitoxose und Digilanidobiose kristallisiert erhalten, ferner Glucose und ein weiterer Zucker (evtl. Diginose oder Cymarose) im Papierchromatogramm nachgewiesen. Bei den fünf neuen Geninen handelt es sich nach ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften um sog. C_{21} -Genine, die mit Diginigenin verwandt sind. Die Genine B, D und F wurden durch

⁵⁶) *H. Kiliiani*, Arch. Pharm. **234**, 481 (1896), fand den Smp. 101° und $[\alpha]_D^{20} = +46^\circ$ (in ?); *B. Iselin & T. Reichstein*, Helv. **27**, 1203 (1944), fanden Smp. 108—110° und $[\alpha]_D^{20} = +37,1^\circ \pm 2^\circ$ (in Me); vgl. auch *O. Schindler & T. Reichstein*, Helv. **35**, 731 (1952).

⁵⁷) Herrn Prof. Dr. *A. Stoll* und Dr. *J. Renz*, SANDOZ AG, Basel, sei auch hier bestens für die Überlassung einer Probe gedankt.

⁵⁸) *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **16**, 1049 (1933), fanden für Digilanidobiose Smp. 215—220°/227° und $[\alpha]_D^{20} = +30,1^\circ \pm ?^\circ$ in W.

O-Acetylderivate charakterisiert. Der Vergleich der isolierten Mengen an C_{21} -Geninen mit denjenigen der Cardenolide erlaubt den Schluss, dass die Blätter der Pflanze neben Glykosiden des Digitoxigenins mindestens gleiche Mengen an herzwirksamen Glykosiden, die sich von den erwähnten C_{21} -Geninen ableiten, enthalten.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

84. Zwei isomere Lactone aus 3α -Acetoxy- 5β -androstan-dion-(11,17).

Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandte Stoffe, 94. Mitteilung¹⁾

von A. Lardon, J. Schmidlin, A. Wettstein und T. Reichstein.

(13. III. 57.)

Kürzlich zeigten *Wendler* und Mitarb.²⁾, dass 3α -Acetoxy- 5β -androstan-dion-(11,17) (I) bei Einwirkung von Benzopersäure in Benzol in das Lacton II übergeht. Dieses Lacton II wird durch Einwirkung von Alkali zu einer ungesättigten Säure V aufgespalten, wodurch seine Konstitution bewiesen wurde.

Anlässlich von Versuchen zur Teilsynthese von Aldosteron haben wir die Einwirkung von Benzopersäure auf das Diketon I ebenfalls durchgeführt⁴⁾. In Eisessig-Chloroform bei 35° und in Gegenwart von *p*-Toluolsulfosäure⁵⁾ erhielten wir ausser II in kleinerer Menge ein isomeres Lacton, dem die Formel IV zukommen dürfte. Die Trennung gelang durch fraktionierte Kristallisation. Eine Chromatographie an SiO_2 war ohne wesentliche Verluste möglich, doch wurde keine brauchbare Trennung erzielt. Hingegen wurden beim Kontakt mit Al_2O_3 beide Lactone allmählich zu Säuren aufgespalten, die sich erst nach Zusatz von Eisessig aus der Säule ablösen liessen⁶⁾. II lieferte dabei eine Säure, der wir die Konstitution VI zuschreiben und die wir

¹⁾ 93. Mitteilung: *J. v. Euw, R. Neher & T. Reichstein* *Helv.* **38**, 1423 (1955).

²⁾ *N. L. Wendler, D. Taub & H. L. Slates*, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 3559 (1955).

³⁾ a) *L. H. Sarett*, *J. biol. Chemistry* **162**, 601 (1946). Bezüglich der Drehung vgl. auch b), *S. Lieberman & K. Dobriner*, *J. biol. Chemistry* **166**, 773 (1946). c) *S. Lieberman, K. Dobriner, B. R. Hill, L. F. Fieser & C. P. Rhoads*, *J. biol. Chemistry* **172**, 263 (1948). d) *H. L. Herzog, M. A. Jevnik, P. L. Perlman, A. Nobile & E. B. Hershberg*, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 266 (1953). e) *M. Finkelstein, J. v. Euw & T. Reichstein*, *Helv.* **36**, 1266 (1953).

⁴⁾ Diese Versuche waren abgeschlossen, bevor die Publikation von *Wendler* und Mitarb.²⁾ erschien.

⁵⁾ Vgl. *H. Levy & R. P. Jacobsen*, *J. biol. Chemistry* **171**, 71 (1947); *G. M. Picha*, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 703 (1952); *J. Fried, R. W. Thoma & A. Klingsberg*, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 5764 (1953); *D. H. Peterson, S. H. Eppstein, P. D. Meister, H. C. Murray, H. M. Leigh, A. Weintraub & L. M. Reineke*, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 5768 (1953).

⁶⁾ Dies erlaubt, das Oxydationsgemisch auf evtl. noch vorhandenes Ausgangsmaterial I zu prüfen.