

- [5] M. BRENNER & H.-CH. CURTIUS, *Helv.* 46, 2126 (1963).
 [6] TH. WIELAND, W. SCHÄFER & E. BOKELMANN, *Liebigs Ann. Chem.* 573, 99 (1951); TH. WIELAND & W. SCHÄFER, *ibid.* 576, 104 (1952); TH. WIELAND & E. BOKELMANN, *Angew. Chem.* 64, 59 (1952).
 [7] R. SCHWYZER, *Helv.* 37, 647 (1954).
 [8] L. A. SHCHUKINA, S. N. KARA-MURZA & G. P. GROMOVA, *Doklady Akad. Nauk SSSR* 136, 135 (1961).
 [9] E. M. FRY, *J. org. Chemistry* 15, 438 (1950).
 [10] J. WEHRMÜLLER, *Diss.* Basel 1955.
 [11] I. PHOTAKI, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 1123 (1963).
 [12] C. ZIUDROU, M. WILCHEK, M. SOKOLOVSKY & A. PATCHORNIK, *Israel J. Chemistry* 2, 326 (1964).
 [13] M. W. CRONIN, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 4726 (1952).
 [14] V. DU VIGNEAUD & G. L. MILLER, *Biochem. Prep.* 2, 74 (1952).
 [15] TH. CURTIUS, *J. prakt. Chem.* [2] 52, 252 (1889).
 [16] A. HARTMANN, nicht publiziert.
 [17] E. STAHL, *Dünnschichtchromatogr.*, Springer 1962, S. 501.
 [18] M. BRENNER & W. HUBER, *Helv.* 36, 1109 (1953).

30. Die Glykoside der Blätter von *Digitalis obscura* L. ssp. *obscura*¹⁾

von Kurt Huber und Kuno Meyer

(7. X. 65)

Digitalis obscura L. ssp. *obscura* kommt im Osten von Spanien (vom südlichen Teil Kataloniens bis hinab zur Sierra Nevada) ziemlich verbreitet vor. In der Literatur [1] werden auch zwei Fundorte für diese *Digitalis*-Art in Marokko angegeben.

Frühere chemische Untersuchungen. Diese Pflanze wurde erstmals von NOVELLA & LONZANO [2] auf ihren Gehalt an Glykosiden hin untersucht. Diese Autoren berichteten über die Isolierung einer als «Obscuraglykosid» bezeichneten Substanz, die, wie weitere Untersuchungen [3] zeigten, keine positive LEGAL- und RAYMOND-Reaktion gab und auch im UV. keine für Cardenolide typische selektive Absorption zwischen 215 und 218 nm zeigte.

Beschaffung des Untersuchungsmaterials. Herr Dr. C. R. GAVILANES²⁾ hatte die Freundlichkeit, uns das Pflanzenmaterial auf der Sierra de Mainò (Alicante) sammeln zu lassen³⁾.

Extraktion und Vortrennung. Die Extraktion der staubfein gemahlenden Blätterdroge erfolgte mit 95-proz. Äthanol. Der (im Vakuum) konzentrierte Auszug wurde mit einer wässrigen Pb(OH)₂-Suspension gereinigt, filtriert und im Vakuum vom Äthanol befreit. Die so gewonnene wässrige Glykosidlösung extrahierte man der Reihe nach erschöpfend mit den in der folgenden Tabelle genannten Lösungsmitteln.

¹⁾ Zur Taxonomie siehe WERNER [1].

²⁾ Wir danken Herrn Dr. GAVILANES (Las Palmas, Gran Canaria) bestens für seine Hilfe bei der Beschaffung des Drogenmaterials.

³⁾ Als Sammeldaten wurden uns angegeben: 13. 5. 1963, 26. 6. 1963 und 19. 12. 1963. Die Trocknung der Blätter erfolgte bei 45°.

Der folgenden Tabelle 1 lässt sich entnehmen, dass der grösste Teil der herzaktiven Substanzen im Chf-Alk-(4:1)-Extrakt enthalten ist. Ein Vergleich der Toxizität von *D. obscura* mit derjenigen des Internationalen *D. purpurea*-Standards zeigt, dass *D. obscura* etwa 2mal toxischer ist.

Eine orientierende Untersuchung der einzelnen Extrakte mit Hilfe der Pchr⁵⁾ gab das folgende Bild:

Ae-Extrakt. Im System KAISER I [5] (absteigend, Laufstrecke der Front 40 cm) konnten mit SbCl₃ 6 Substanzen nachgewiesen werden, wovon 2 im UV.-Licht eine hellblaue Fluoreszenz zeigten. Mit KEDDE-Reagens [4] färbten sich nur 4 Substanzen, deren unpolarste einen dem Acetyldigitoxin (4) entsprechenden Rf-Wert aufwies.

Tabelle 1. Ausbeuten an Rohextrakten aus 1,2 kg Blattpulver von *D. obscura*⁴⁾

Extrakt ⁵⁾	Menge in g	in %	Toxizität mg/kg ⁶⁾	Anzahl K. D. ⁷⁾
Ae	6,46	0,54		
[Soda-Auszug der Ae-Extrakte]	[2,87]	[0,24]		
Chf	7,12	0,59	3,5 ± 0,8	1700
Chf-Alk-(4:1)	42,3	3,52	2,7 ± 0,5	13000
Chf-Alk-(3:2)	- ⁸⁾			
<i>D. obscura</i> (Blattpulver)			56 ± 1	18000
<i>D. purpurea</i> (Standard)			106 ± 8	9500

Chf-Extrakt. Im System KAISER II [5] (absteigend, 5 Std.), konnten mit SbCl₃ etwa 8 Substanzen deutlich gemacht werden, wovon 6 im UV.-Licht eine hellblaue Fluoreszenz zeigten. Mit KEDDE-Reagens [4] besprüht, bildeten sie 3 langgezogene Flecke, deren Rf-Werte denjenigen der Lanatoside A (3), B (7) und E (11) entsprachen.

Chf-Alk-(4:1)-Extrakt. Im System KAISER II [5] (absteigend, 3¹/₂-4 bzw. 21 Std.) liessen sich mit SbCl₃ 8-9 Substanzen sichtbar machen. Davon färbten sich 5 auch mit KEDDE-Reagens [4]. Die Rf-Werte (Reihenfolge entsprechend zunehmender Polarität) dieser Substanzen entsprachen denjenigen von Lanatosid A (3), Lanatosid E (11), Purpureaglykosid A (1) und Lanatosid B (7)⁹⁾, Glucogitaloxin (9), Purpureaglykosid B (5) und Glucogitorosid (8).

1. Untersuchung des Äther-Extraktes. - Der mit verd. Sodalösung gründlich ausgeschüttelte Ae-Extrakt (Aufarbeitung der vereinigten Sodauszüge siehe weiter

⁴⁾ Diese in Tab. 1 aufgeführten Angaben beziehen sich auf das am 1. 6. 1964 gesammelte Blattmaterial.

⁵⁾ Abkürzungen für Lösungsmittel usw. s. d. Einleitung zum Exper. Teil.

⁶⁾ Die Toxizitätsbestimmung (Methode nach HATCHER-MAGNUS an der Katze) wurde von den Herren Drs. A. HÜRLIMANN und H. P. BÄCHTOLD in den Pharmakologischen Laboratorien der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel, ausgeführt, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

⁷⁾ K. D. = Katzendosis. Die in dieser Kolonne angegebenen Werte sind auf 1,0 kg (!) Droge umgerechnet.

⁸⁾ Dieser Extrakt war KEDDE [4]-negativ und wurde deshalb verworfen.

⁹⁾ Lanatosid B (7) hat praktisch den gleichen Rf-Wert wie 1. Im Lanatosid B lässt sich die O-Acetylgruppe durch verd. NH₃-Lösung leicht verseifen, wobei Purpureaglykosid B (5) entsteht, das sich in der Polarität dann stark vom Purpureaglykosid A (1) unterscheidet.

unten) wurde zunächst durch Chromatographie an SiO_2 einer groben Aufteilung unterzogen. Das erste Drittel der eluierten Substanz (z. T. als farblose, rotbraun, rot oder grün gefärbte ölige bzw. amorphe Fraktionsrückstände erhalten) war KEDDE-negativ. Nach erneuter chromatographischer Auftrennung des aus den ersten Eluaten gewonnenen rotbraun bzw. rot gefärbten Materials konnte ein (im DC einheitliches) in gelbroten, feinen Nadeln kristallisierendes Pigment vom Smp. 213–217° (*Pigment I*) gewonnen werden.

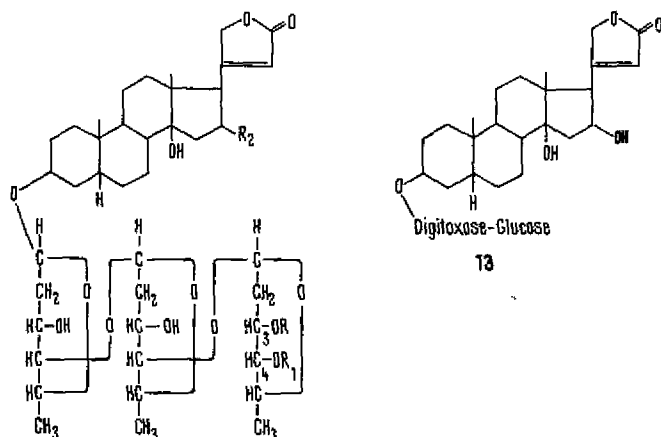
Aus den nachfolgenden KEDDE-positiven Fraktionen der obigen groben Aufteilung liess sich nach erneuter Chromatographie nur eine kristallisierte Substanz vom Smp. 152–162° gewinnen, die sowohl bei der Reaktion nach KEDDE [4] als auch mit Xanthydrol [17] eine Färbung gab (Cardenolid mit 2-Desoxyzucker) und im DC den gleichen Rf-Wert wie *Acetyldigitoxin* (4) hatte. Durch Verseifung mit verd. NH_3 [18]¹⁰⁾ entstand aus dem Glykosid vom Smp. 152–162° Digitoxin (nur im DC nachgewiesen). Dabei wurde beobachtet, dass α - und β -Acetyldigitoxin sich im Rf-Wert (DC) zwar wenig, in der Färbung dagegen sehr deutlich unterscheiden (siehe Exper. Teil).

Bei der oben erwähnten groben chromatographischen Aufteilung konnte nach der Eluierung des Acetyldigitoxins eine geringe Menge eines KEDDE-negativen Produktes von der Säule gelöst werden, welches nach erneuter Chromatographie Kristalle vom Smp. 241–246° gab (*Substanz a*). Weitere Angaben siehe weiter unten (Fermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes).

Die mit roter Farbe in verd. Sodalösung löslichen Anteile des Ae-Extraktes (siehe oben) wurden nach dem Ansäuern in Ae zurückgeschüttelt. Das dabei erhaltene dunkelbraune Produkt war grösstenteils in An löslich. Der unlösliche Anteil (etwa 10%) erwies sich im DC als einheitlich (das in An lösliche Material gab 7 Flecke und wurde nicht näher untersucht) und dürfte ein bisher in der Gattung *Digitalis* noch nicht beobachtetes Flavon (*Pigment II*) vom Zers.-Punkt bei etwa 320° sein. Über die Pigmente I und II soll später in anderem Zusammenhang berichtet werden.

2. Untersuchung des Chloroform-Extraktes. – Nach chromatographischer Aufteilung liess sich nur ein kleiner Teil der Fraktionen [mit Chf-Me-(4:1)] kristallisieren. Die Kristallisate waren nach DC nicht einheitlich und konnten auch nach erneuter Chromatographie an SiO_2 nicht in die einzelnen Komponenten zerlegt werden. Die Kristallfraktionen enthielten nach Pchr die Lanatoside A (3), B (7) und E (11). Nach längerem Einwirken von verd. NH_3 -Lösung bestand das Produkt nach DC aus

¹⁰⁾ Zur Verseifung von O-Acetylgruppen, vor allem im Zuckeranteil acetylierter Glykoside, ist vielfach die von REICHSTEIN und Mitarb. [19] angegebene Methode (KHCO_3 in wässrigem Methanol) verwendet worden. Sehr verdünntes NH_3 wurde von den rumänischen Autoren [18] zur Verseifung der Formylgruppe in Gitaloxigenin-Glykosiden empfohlen, wobei offenbar O-Acetylgruppen (im Zuckeranteil) nicht angegriffen wurden. Wir fanden (siehe Exper. Teil), dass mit verd. NH_3 -Lösung auch die in der 3. Digitoxose-Molekel der Lanatoside befindliche O-Acetylgruppe leicht und auf einfachere Weise als mit KHCO_3 verseift wird. Lässt man auf ein Gemisch, das nach DC etwa aus gleichen Teilen des α - und β -Isomeren besteht, verd. NH_3 einwirken, so erscheint nach einer gewissen Zeit im DC neben dem Fleck des Digitoxins (2) nur noch der des β -Acetyldigitoxins. Dass das α -Isomere (mit *axialer* Acetoxygruppe) leichter verseift wird, erscheint wenig wahrscheinlich. Unter dem Einfluss des verd. NH_3 könnte aber die Acylwanderung [von C-3 (axial) = α nach C-4 (äquatorial) = β siehe Formel 4] viel rascher verlaufen als die Verseifung der Acetoxygruppe.



1	R = H	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = H	: Purpureaglykosid A [6]
2	R = H	R ₁ = H	R ₂ = H	: Digitoxin [7] [8]
3	R = Ac	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = H	: Lanatosid A [7]
4	R = Ac	R ₁ = H	R ₂ = H	: Acetyldigitoxin [9]
5	R = H	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = OH	: Purpureaglykosid [6]
6	R = H	R ₁ = H	R ₂ = OH	: Gitoxin [10]
7	R = Ac	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = OH	: Lanatosid B [7]
8	R = Ac	R ₁ = H	R ₂ = OH	: Acetylgitoxin [11]
9	R = H	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = OCHO	: Glucogitaloxin [12]
10	R = H	R ₁ = H	R ₂ = OCHO	: Gitaloxin [12]
11	R = Ac	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = OCHO	: Lanatosid E [14]
12	R = Ac	R ₁ = H	R ₂ = OCHO	: Acetylgitaloxin [15]
13	Glucogitorosid [16]			

den Lanatosiden A (3) und B (7) sowie aus den Purpureaglykosiden A (1) und B (5) [Verseifung sowohl der Formyl- (an C-16) als auch z. T. der O-Acetylgruppe in der Zuckerkette]. – Aus diesem Glykosid-Gemisch liess sich dann das *Lanatosid A* (3) als einheitliches Kristallisat gewinnen.

3. Untersuchung des Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extraktes. – *Versuche zur Auftrennung der Primärglykoside.* Weder durch Verteilungschromatographie an Hyflo Supercel/Wasser als ruhender Phase und wassergesättigtem Methyläthylketon oder Chloroform-Butanol-Gemischen als beweglicher Phase [20], noch mit wasserhaltigem SiO₂ und wassergesättigtem Essigester [21] gelang es, einheitliche Kristallisate zu gewinnen. Diese gaben alle im DC 2–3 Flecke, die ungefähr den R_f-Werten der Purpureaglykoside A (1) und B (5) entsprachen.

Isolierung der Substanz A. Nur aus der Verteilungschromatographie mit Chloroform-Butanol-Gemischen liess sich ein einheitliches, allerdings KEDDE-negatives Kristallisat vom Smp. 207–214° gewinnen, das wir vorläufig als Substanz A bezeichnen. Diese gab eine positive Xanthhydrol-Reaktion (auf 2-Desoxyglykoside) und liess sich auf fermentativem Wege in ein Desgluco-Produkt überführen, das sich im DC identisch mit der aus dem Ae-Extrakt isolierten Substanz a erwies. Die IR.-Spektren der beiden Substanzen A und a zeigen keine signifikanten Unterschiede. Der Mehr-

gehalt an Glucose in Substanz A hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Struktur des IR.-Spektrums.

Da eine Auftrennung der Primärglykoside, wie eben erwähnt, erfolglos blieb, versuchten wir eine Aufteilung der Glykoside auf der Desgluco-Stufe zu erzielen. Die Abspaltung der endständigen Glucose liess sich relativ leicht mit Fermentgemischen aus Schimmelpilzen¹¹⁾ durchführen. Den Fermentierungsansätzen wurden durch Ausschütteln mit Chf die Desgluco-Produkte entzogen, die je nach Drogenmuster zwischen 24 und 51% des zur Fermentierung eingesetzten Chf-Alk-(4:1)-Extraktes ausmachten. Die hierauf durch Ausschütteln der Fermentierungslösung mit Chf-Alk-(4:1) zurückgewonnenen nichtfermentierten Anteile betrugen zwischen 34 und 54%. Sie wurden nachfermentiert und gaben wiederum in Chf lösliche Anteile, die im DC praktisch dasselbe Fleckenmuster zeigten, wie die aus den ersten Fermentierungsansätzen erhaltenen Gemische der Desgluco-Produkte. Bei gewissen Drogenchargen machten wir die Beobachtung, dass unter Berücksichtigung der bei der Fermentierung abgespaltenen Glucose (Purpureaglykosid A \rightarrow Digitoxin + Glucose) die Summe der durch Chf und Chf-Alk-(4:1) ausschüttelbaren Anteile kleiner war als die Menge des jeweils zur Fermentierung eingesetzten Materials [Chf-Alk-(4:1)-Extrakt]. Diese «Verluste» machten 3,6% (Fehlergrenze) bis 37% aus und entsprachen jeweils den durch Eindampfen der wässrigen Phasen erhaltenen Trockenrückständen. Es handelte sich demnach bei diesen «Verlusten» – wenn man von der Glucose absieht – um Material, das nach (oder infolge) der Fermentierung nicht mehr ausschüttelbar ist. Tab. 2 illustriert an einem Beispiel diese Beobachtung.

Tabelle 2. Desgluco-Produkte und «Verluste» nach Fermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes

Chf-Alk-(4:1)-Extrakt in g	Chf-Auszug		Chf-Alk-(4:1)- Auszug		Im Wasser verblieben		Glucose ¹²⁾ in %	Verlust in %
	in g	in %	in g	in %	in g	in %		
1. Fermentierung 13,2	5,70	43,3	4,84	36,8	2,70	20,5	10,2	10,3
1. Nachfermentierung 4,84	1,27	26,2	2,3	47,6	1,24	25,7	6,2	19,5
2. Nachfermentierung 2,3	0,40	17,5	1,24	54,0	0,66	28,7	4,1	24,6

Eine verdorbene Drogencharge¹³⁾ gab auffallenderweise einen Chf-Alk-(4:1)-Extrakt, der nach Fermentierung und Aufarbeitung die geringsten «Verluste» (3,6%) zeigte.

Aus Tab. 2 ist u. a. auch ersichtlich, dass bei der Nachfermentierung jeweils weniger Desgluco-Produkte gebildet werden, und dass prozentual auch die Anteile an «Verlusten» zunehmen.

¹¹⁾ Wir möchten auch an dieser Stelle der Firma RÖHM & HAAS, GMBH., Darmstadt, für das uns überlassene Muster dieses Enzympräparates bestens danken. Nach Angaben der genannten Firma enthält das als Präparat E. L. 33-63 bezeichnete Fermentgemisch Pektinasen, Cellulasen und andere β -Glucosidasen aus Schimmelpilzkulturen (Wirkungsoptimum bei pH 4-5,5).

¹²⁾ Die Menge der abgespaltenen Glucose wurde auf der Basis Purpureaglykosid A (MG. 927) \rightarrow Digitoxin (MG. 765) + Glucose (MG. 180) berechnet.

¹³⁾ Diese war in angesammeltem und feuchtem Zustand eingetroffen. Nach Auslesen der am meisten verdorbenen Anteile wurde der Rest bei 45° getrocknet, wobei eine stark braun gefärbte Droge resultierte.

Die im Wasser verbliebenen, nicht mehr ausschüttelbaren Anteile (= «Verluste») waren KEDDE-negativ. Die Prüfung auf 2-Desoxyzucker (Digitoxose) mit Xanthhydrol-Reagens gab kein eindeutiges Resultat, da das geprüfte Material stark gefärbt war. Im Pchr und im DC liess sich Glucose leicht nachweisen. Sie konnte ausserdem in Form des kristallisierten Phenylsazons isoliert und charakterisiert werden. Digitoxose war weder im Pchr noch im DC nachweisbar. Die beobachteten «Verluste» können somit nicht allein durch die Abspaltung der Glucose erklärt werden, sondern müssen eine andere Ursache haben. Dass unter dem Einfluss des Enzympräparates grössere Zuckerreste, wie z. B. Digilanidobiose, abgetrennt werden, ist unwahrscheinlich, da dieses Disaccharid durch das verwendete Fermentpräparat sehr rasch in Glucose und Digitoxose gespalten wird. Da zudem der Hauptteil der mit Chf-Alk-(4:1) ausschüttelbaren Glykoside nach DC ein Gemisch der Purpureaglykoside A und B und der Lanatoside A, B und E darstellt (siehe weiter unten), können die «Verluste» auch nicht dadurch erklärt werden, dass Glykoside mit mehreren Glucoseresten ursprünglich vorgelegen hatten.

Um hier einen gewissen Einblick zu gewinnen, wurde versucht, die Glucose quantitativ zu bestimmen. Dazu wurden die eingeeengten Wasserphasen (der ausgeschüttelten Fermentierungsansätze) verwendet. Sie stellten einen stark gelbbraun gefärbten Sirup dar. Mit den für den Glucosenachweis spezifischen Testpapieren («LILLY Test-Tape»), wie sie zur Glucosebestimmung im Harn verwendet werden, konnte ein Glucosegehalt von *nur* rund 10% (bezogen auf den Trockenrückstand) ermittelt werden. Mit der Methode nach FEHLING (Ausfällung von Cu_2O) enthielt der Trockenrückstand demgegenüber 60% an reduzierenden Stoffen (als Glucose berechnet). Obwohl mit dieser Methode auch andere reduzierende Stoffe erfasst werden, ergibt sich trotzdem noch ein «Verlust» von 40%¹⁴⁾.

Aufarbeitung der durch Fermentierung gewonnenen Desgluco-Produkte. –

1. *Isolierung von Digitoxin (2)*. Nach Chromatographie an SiO_2 liess sich aus einer Reihe von Fraktionen [mit Chf-Me-(4:1)] nicht ganz reines Digitoxin (2) gewinnen, das aber nach erneuter Auftrennung an SiO_2 völlig rein erhalten werden konnte.

2. *Isolierung von Gitaloxin (10)*. Bei der eben unter 1. erwähnten SiO_2 -Chromatographie waren Digitoxinkristallisate erhalten worden, die im DC mit SbCl_3 nur einen schwach blau fluoreszierenden Fleck gaben, dessen Rf-Wert identisch mit dem des Digitoxins war. Im Pchr (System KAISER I [5]) hingegen liess sich neben einem im UV. nicht fluoreszierenden Fleck (Digitoxin) ein schwächerer, durch eine polarere und hellblau leuchtende Substanz hervorgerufen, feststellen. Durch präparative Pchr konnte das polare Produkt in papierchromatographisch einheitlichen Kristallen vom Smp. 256–260° gewonnen werden. Es erwies sich beim direkten Vergleich¹⁵⁾ als Gitaloxin (10). Nach dem Verseifen mit verd. NH_3 [18] entstand daraus Gitoxin (6).

3. *Isolierung von Gitoxin (6) und Anreicherung des Glykosids GX*. Im Anschluss an das Gemisch Digitoxin-Gitaloxin wurde ein weiteres Gemisch zweier KEDDE-positiver

¹⁴⁾ Nach Abschluss dieser Untersuchungen wurde mit einem Belegmuster eines nichtfermentierten Chf-Alk-(4:1)-Extraktes die FEHLING'sche Probe ausgeführt, die stark positiv ausfiel. Für eine quantitative Bestimmung der reduzierenden Bestandteile reichte die zur Verfügung stehende Menge des Musters leider nicht mehr aus.

¹⁵⁾ Wir danken Herrn Dr. F. KAISER, C. F. BOEHRINGER & SÖHNE, GMBH, Mannheim, bestens für die Überlassung dieser und einer Reihe weiterer Proben von Digitalisglykosiden.

[5] Substanzen eluiert. Die im DC nach dem Besprühen mit $SbCl_3$ -Lösung erhaltenen Flecke dieser beiden Substanzen zeigten im UV. die für Gitoxigeninglykoside charakteristische hellblaue Fluoreszenz. Durch präparative DC liess sich das unpolare Produkt rein erhalten und als Gitoxin (6) identifizieren. Die polarere Substanz mit Gitoxigenincharakter - vorläufig als GX bezeichnet - konnte nicht frei von 6 erhalten werden. Eine Identifizierung auf Grund des Rf-Wertes im DC war nicht möglich. Von den bekannten Gitoxigeninglykosiden, die im DC polarer als Gitoxin sind und ähnliche Rf-Werte wie die Substanz GX haben, kommen nur Strosposid [22] und Verodoxin [23] in Frage. Beim direkten Vergleich mit diesen Glykosiden zeigte sich aber, dass die Substanz GX deutlich polarer ist. Gitoxigeninglykoside, die eine Einheit Glucose mehr besitzen, wie z. B. Digitalinum verum [10] [24] [22], Glucoverodoxin [25] usw. kommen *a priori* in Wegfall, da bei der Fermentierung die endständige Glucose abgespalten worden wäre. Abgesehen davon sind diese Glucoprodukte im DC wesentlich polarer als GX.

4. *Nachweis von Acetyldigitoxin (4) und Acetylgitaloxin (12)*. Diese beiden Glykoside wurden bei der Chromatographie der durch Fermentierung gewonnenen Desgluco-Produkte als erste KEDDE-positive [5] Substanzen von der SiO_2 -Säule eluiert und waren sehr schwer von dem sie begleitenden Digitoxin abzutrennen. Bei einem durch Nachfermentierung gewonnenen Gemisch von chloroformlöslichen Desgluco-Produkten (siehe Tab. 2) konnte nach erneuter Chromatographie an SiO_2 ein Kristallinat gewonnen werden, das nach DC (in zwei verschiedenen Systemen) einheitlich zu sein schien, nach Pchr (System KAISER I [6]) dagegen 2 Substanzen enthielt, deren Rf-Werte denjenigen von Acetyldigitoxin (4) und Acetylgitaloxin (12) entsprachen. Wegen Substanzknappheit wurde auf eine Auftrennung dieser beiden Glykoside im präparativen Pchr verzichtet. Nach Verseifen einer kleinen Probe mit verd. NH_3 -Lösung konnte sowohl im DC als auch im Pchr Digitoxin (2), Acetylgitoxin (8) und Gitoxin (6) nachgewiesen werden. Der Nachweis von Acetyldigitoxin (4) und Acetylgitaloxin (12) in den durch Fermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes gewonnenen Produkten ist indirekt auch ein Beweis dafür, dass in der Pflanze die Lanatoside A (3) und E (11) enthalten sind. Diese Lanatoside konnten auch im Chf-Extrakt nachgewiesen werden (siehe oben).

5. *Isolierung von Substanz a*. Aus den mit Chf extrahierbaren Anteilen der 2. Nachfermentierung (siehe Tab. 2) eines Chf-Alk-(4:1)-Extraktes konnte nach der Chromatographie an SiO_2 ein einheitliches Kristallinat vom Smp. 241–246° und $[\alpha]_D = -23^\circ$ erhalten werden, welches im Pchr und im DC sehr polar war (wesentlich polarer als Gitoxin¹⁶): Substanz a. Die gleiche Substanz war auch im Ae-Extrakt (siehe Exper. Teil) aufgefunden worden. Sie stellt ein 2-Desoxyglykosid (positive Xanthhydroprobe) dar. Der nach milder Hydrolyse gewonnene zuckerteil enthielt nach DC und Pchr neben Digitoxose noch einen weiteren, polareren 2-Desoxyzucker (positive Xanthhydroprobe), der bisher aber noch nicht identifiziert werden konnte. Der Aglykonanteil bestand nach DC aus mindestens 4 Substanzen. Er wurde nicht weiter untersucht. - Die Substanz a zeigt im UV. nur Endabsorption. Damit kann es sich bei diesem Glykosid nicht um ein Cardenolid handeln. Auch die KEDDE-Reak-

¹⁶) Substanz a kommt in der Pflanze - wie oben bereits erwähnt - in genuiner Form als Glucosid-Verbindung (= Substanz A) vor.

tion [5] fiel negativ aus. Da die Digitanolglykoside – wenigstens die bisher aufgefundenen – im Bereich von 300 nm selektive Absorption zeigen, dürfte die Substanz auch nicht dieser Stoffklasse angehören. Dass es sich schliesslich um ein Saponin handeln könnte, ist auf Grund des IR.-Spektrums wenig wahrscheinlich, da diesem die für Saponine typischen Banden fehlen. Das Molekulargewicht wurde mit rund 700 ermittelt. Die Elementaranalyse passte auf die Bruttoformel $C_{36}H_{60}O_{12}$.

Der eine von uns (K. H.) dankt dem STIPENDIENFONDS ZUR UNTERSTÜTZUNG VON DOKTORANDEN AUF DEM GEBIETE DER CHEMIE für das ihm gewährte Stipendium. Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS danken wir für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit und Frl. SIGRID SPENGLER für ihre gewissenhafte und sorgfältige experimentelle Mitarbeit.

Experimenteller Teil

Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze bis 200° , $\pm 2^{\circ}$, darüber $\pm 3^{\circ}$. Zur Säulenchromatographie wurde meist Kieselgel (SiO_2 *MERCK*, 0,05–0,2 mm) verwendet.

Abkürzungen: Ac_2O = Acetanhydrid, $AcOH$ = Eisessig, Ae = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Bz = Benzol, Bu = *n*-Butanol, Chf = Chloroform, Di = Dioxan, DC = Dünnschichtchromatographie oder Dünnschichtchromatogramm, Fmd = Formamid, $KEDDE-(+)$ bzw. $-(-)$ = $KEDDE$ -positiv bzw. -negativ, Fr = Fraktion(en), Me = Methanol, Mek = Methyl-äthylketon, ML = eingedampfte Mutterlauge(n), $Pchr$ = Papierchromatographie bzw. Papierchromatogramm, Pe = Petroläther, Pn = *n*-Pentan, RV = Rotationsverdampfer, $SbCl_3$ = 20-proz. $SbCl_3$ in Chf , Py = Pyridin, To = Toluol, $Tr.$ = Tropfen, $UV.$ für DC und $Pchr$ = UV.-Licht von ca. 350 nm, W = Wasser.

Extraktion der Blätter. – Beispiel: 1,2 kg lufttrockene, staubfein gemahlene Blätter wurden mit 2 l Alk aufgeschlämmt und 1 Std. unter gelegentlichem Rühren im Wasserbad bei 60° stehengelassen. Hierauf wurde noch warm durch eine mit Hyflo Supercel gedichtete Nutsche filtriert, die Blattpulverschicht sorgfältig abgehoben und diese mit 1,5 l frischem Alk wie bei der ersten Extraktion ausgezogen und durch dieselbe Nutsche filtriert. Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis das extrahierte Blattpulver nur noch sehr wenig bitter schmeckte (was nach 7–9 Extraktionen der Fall war). Die einzelnen Filtrate wurden gesondert im Vakuum bei 50° eingengt (der erste Extrakt auf etwa 200 ml, die späteren jeweils auf etwa 50 ml) und vereinigt. Der total etwa 600–700 ml betragende, dunkelgrün gefärbte, etwas viskose Extrakt wurde mit 600–700 ml einer Aufschlämmung von frisch (aus 1,3 kg Bleiacetat-trihydrat) gefällt und mit kaltem Wasser neutral gewaschenem $Pb(OH)_2$ versetzt und 30 Min. geschüttelt. Hierauf wurde durch eine mit Hyflo Supercel gedichtete Nutsche filtriert, der $Pb(OH)_2$ -Niederschlag mit 300 ml 50-proz. Alk nachgewaschen, der Filtrückstand abgehoben, in 500 ml 50-proz. Alkohol aufgeschlämmt, 15 Min. geschüttelt, abgenutscht und noch 2mal mit 80-proz. Alk in gleicher Weise ausgezogen. Die vereinigten Filtrate (etwa 3,5 l) wurden mit verd. H_2SO_4 auf ein pH von 5,8 gebracht und im RV bei 40° und etwa 12 Torr vom Alk befreit (Endvolumen 700–800 ml). Die wässrige Glykosidlösung wurde nun im Scheidetrichter 8mal mit je 1,5 l Ae , 6mal mit je 1 l Chf , 7–9mal mit je 1 l Chf - Alk -(4:1) (bis $KEDDE$ -(-)) ausgeschüttelt. [Die mit Chf - Alk -(3:2) extrahierte Substanz war $KEDDE$ -(-).] Alle Auszüge passierten der Reihe nach noch 3 Scheidetrichter, die je 150 ml W enthielten, und wurden dann über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Die Ae -Auszüge wurden als einzige noch zusätzlich 5mal mit je 150 ml verd. $Soda$ -Lösung gewaschen. Die rot gefärbten, wässrigen $Soda$ -Auszüge wurden nach dem Ansäuern mit verd. H_2SO_4 mit Ac erschöpfend extrahiert und die Ae -Phasen nach Waschen mit W und Trocknen über Na_2SO_4 und Filtrieren im Vakuum eingedampft. Der dabei erhaltene Rückstand enthielt das Pigment II (siehe weiter unten). Über die aus den verschiedenen Ausschüttelungen erhaltenen Ausbeuten orientiert ein in Tab. 1 im Theoret. Teil wiedergegebenes Beispiel.

Untersuchung des Ae -Extraktes. – *Vortrennung durch Chromatographie an SiO_2 .* Ein mit verd. Na_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelter Ae -Extrakt (Trockengewicht 12,3 g) wurde über eine mit Pe - Bz -(1:1) bereite SiO_2 -Säule (300 g) chromatographiert (Fr zu 100 ml). In 67 Fr konnten total 11,3 g (91%) der eingesetzten Substanzmenge wieder von der Säule eluiert werden. – Die mit

Pc-Bz-(1:3) gewonnenen Eluate gaben 85 mg öligen, farblosen Eindampfrückstand, der KEDDE-(-) war und nicht weiter untersucht wurde. Das hierauf mit Pc-Bz-(1:6), Bz, Chf und Chf-Me-(9:1) eluierte, ebenfalls KEDDE-(-) Material war rotbraun bzw. grün gefärbt, wog 680 mg und enthielt Pigment I (siehe weiter unten). Beim weiteren Durchwaschen der Säule mit Chf-Me-(9:1) konnte im ganzen 9,8 g KEDDE-(+) Material erhalten werden. Mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch liessen sich hierauf noch 640 mg Substanz eluieren, die KEDDE-(-) war: enthielt die Substanz a (siehe weiter unten). Die folgenden mit Chf-Me-(4:1) und Me gewonnenen Fr enthielten ebenfalls nur KEDDE-(-) Material, das nicht näher untersucht wurde. Die KEDDE-(+) Fr-Rückstände zeigten im DC jeweils mehrere Flecke.

Isolierung von Pigment I. Die oben erwähnten, das Pigment I enthaltenden Fr-Rückstände (680 mg) der Gross-Chromatographie wurden nochmals an SiO_2 aufgeteilt. Aus den Fr mit Bz-Pc-(7:3) konnte eine kleine Menge einer in gelbroten Nadeln kristallisierenden Substanz vom Smp. 213–217° isoliert werden. Weitere kleine Mengen dieses Farbstoffes liessen sich nur auf folgende Weise gewinnen: die ML wurden auf einer kleinen SiO_2 -Säule so lange mit Chf-Bz-(3:7) entwickelt, bis der gelbrote Farbstoff als isolierte Zone gut abgegrenzt war. Nun wurde das Durchwaschen unterbrochen, das SiO_2 vorsichtig ausgetossen, die Farbstoffzone abgetrennt und diese mit Chf-Me-(3:1) eluiert. Es konnten so im ganzen nur 17 mg des Pigmentes I gewonnen werden. Die Acetylverbindung bildet hellgelbe Nadelchen vom Smp. 130–132°.

Isolierung von Acetyldigitoxin (4). Der erste KEDDE-(+) reagierende Eindampfrückstand (2,6 g) der Chf-Me-(9:1)-Eluate der obigen Gross-Chromatographie wurde nochmals in 44 Fr an SiO_2 aufgeteilt. Aus der 37. Fr [mit Chf-Me-(99:1)] konnten Kristalle gewonnen werden, die nach dem Umlösen aus Me-Ae 42 mg Nadelchen vom Smp. 152–162° gaben. Im DC [System Chf-Me-(9:1)] nur ein Fleck, der den gleichen Rf-Wert wie Acetyldigitoxin aufwies. Nach Verseifen mit verd. NH_3 liess sich im DC ein polarerer Fleck mit dem Rf-Wert des Digitoxins nachweisen. Das isolierte Acetyldigitoxin stellte ein Gemisch von α - und β -Acetyldigitoxin dar. Unterscheidung der beiden Digitoxine im DC: wird die Platte [Rillenglas] [26] langsam erhitzt, so ist der auftretende Fleck in seinem oberen Teil violett (β -Acetyldigitoxin), im gleich daran anschliessenden unteren Teil (α -Acetyldigitoxin) braun gefärbt. Beim weiteren Erhitzen gehen die beiden Farben in ein einheitliches Graublau über¹⁷⁾. Wir haben das aus *D. obscura* isolierte Acetyldigitoxin-Gemisch nach STOLL & KREIS [9] in das α - und β -Isomere getrennt: das β -Acetyldigitoxin (feine Nadeln) schmolz bei 230–245° [die Mischprobe mit authentischer Substanz¹⁷⁾ bei 225–242°, die Mischprobe mit dem α -Produkt bei 150–170°; das α -Acetyldigitoxin (rechteckige, klare Quadern) schmolz bei 208–220°. – Wird 0,5 mg des Mischkristallisates, in 2 Tr. Chf und 2 Tr. Me gelöst, mit 1 Tr. 1N NH_3 -Lösung versetzt und in kurzen Zeitabständen im DC kontrolliert, so lässt sich in diesem schliesslich neben Digitoxin nur noch β -Acetyldigitoxin nachweisen.

Isolierung der Substanz a. Das mit Chf-Me-(9:1) bei der obigen Gross-Chromatographie eluierte KEDDE-(-) Material (640 mg) wurde nochmals an einer SiO_2 -Säule aufgetrennt. Die aus den Fr mit Chf-Me-(19:1) und -(9:1) gewonnenen Eindampfrückstände gaben aus An-Me 122 mg feine Nadelchen vom Smp. 207–210° (rohe Substanz a). Durch präparative Pchr wurde analog wie bei der Isolierung des Gitaloxins (siehe weiter unten) reine Substanz a vom Smp. 241–246° erhalten. Weitere Einzelheiten über dieses Produkt siehe weiter unten (Fermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes).

Isolierung von Pigment II. Die aus den Sodauszügen der Ae-Extrakte gewonnene braungelbe Substanz wurde mit An versetzt, das einen grossen Teil der färbenden Bestandteile aufnahm und ein gelbgrünes Pulver ungelöst zurückliess. Dieses konnte in viel Chf-Me in Lösung gebracht werden und schied sich beim Wegdampfen des Lösungsmittels wieder als gelbliches leicht grünstichiges kristallines Pulver aus. Smp. ca. 320° (Zers.). Die Acetylverbindung – in Py-Ac₂O bereitet – gab nach 2maligem Umlösen aus Essigester hellgelbe, feine Nadelchen. Smp. 214–218°.

Untersuchung des Chf-Extraktes. – 15,9 g Chf-Extrakt (aus 2,35 kg Blattpulver) wurden an 300 g SiO_2 in 69 Fr aufgeteilt (Fr zu 100 ml). Zum Entwickeln der Chromatographie diente zunächst Chf-Bz-(1:1), Chf-Bz-(3:1), Chf und Chf-Me-(99:1) bzw. -(49:1). Erst von der 24. Fr mit Chf-Me-(24:1) an wurden nach dem Verdampfen des Lösungsmittels Rückstände erhalten. Aus

¹⁷⁾ Herrn Dr. A. von WARTBURG, SANDOZ AG., Basel, danken wir für die Überlassung von α - und β -Acetyldigitoxin-Proben.

24 Fr [bis Chf-Me-(4:1)] liessen sich im ganzen etwa 8 g Substanz gewinnen, die z. T. ein grün, z. T. ein braun gefärbtes Öl darstellten. Die ersteren waren eindeutig KEDDE(-), die späteren KEDDE(?). Aus diesen Fr konnten keine Kristalle gewonnen werden. Sie wurden nicht mehr weiter untersucht. Die Fr 48-54 [mit Chf-Me-(4:1)] gaben nach dem Verdampfen 3,7 g Substanz, die eindeutig KEDDE(+) war. Aus den Fr 50-53 konnten total 1,26 g Kristalle gewonnen werden, die nach dem DC mehrere Substanzen enthielten. Eine erneute Aufteilung an SiO_2 gab 0,59 g eines Kristallisates, das im DC [System Chf-Me-(9:1)] nur noch 2 Flecke, im Pchr (System KAISER 1) dagegen 3 Flecke gab, deren Rf-Werte denjenigen der Lanatoside A, B und E entsprachen. Dass diese Glykoside in diesem Mischkristalliat wirklich vorlagen, liess sich wie folgt beweisen: 0,48 g des Mischkristallisates wurden in 8 ml Me und einigen Tr. Chf gelöst, mit 2,5 ml einer wässrigen 1N NH_3 -Lösung versetzt und $1\frac{1}{2}$ Tage bei 20° stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde hierauf mit W verdünnt, das Me im Vakuum entfernt, die wässrige Lösung mit Chf-Alk-(4:1) extrahiert, dieses über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Der erhaltene Rückstand gab im DC 4 Flecke, deren Rf-Werte denjenigen von Lanatosid A und B und Purpureaglykosid A (aus Lanatosid A entstanden) und Purpureaglykosid B (aus Lanatosid B und E entstanden) entsprachen.

Isolierung von Lanatosid A (3). Bei der chromatographischen Aufteilung dieses 4-Komponenten-Gemisches an 15 g SiO_2 liess sich lediglich aus einem Teil der Fr mit Chf-Me-(19:1) ein einheitliches Kristalliat (73 mg) gewinnen, das bei $238-243^\circ$ schmolz und identisch mit Lanatosid A (3) ⁷ war.

Untersuchung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes. - *Versuche zur Auftrennung der Primärglykoside.* - 1. Durch Verteilungschromatographie an mit W (1:1) beladenem Hyflo Supercel als stationärer und mit W-gesättigtem Mek als mobiler Phase [20] konnte keine Auftrennung erzielt werden. Alle Fr enthielten nach DC praktisch dasselbe Gemisch von mindestens 4 KEDDE-(+) Substanzen.

2. Eine Verteilungschromatographie an Kieselgel mit 12,5% W als stationärer und W-gesättigtem Essigester als mobiler Phase [21] ergab eine teilweise Auftrennung des Gemisches, wobei aber immer Mischkristalliate erhalten wurden, die auch nach erneuter analoger Verteilung nie zu einheitlichen Substanzen führte. Zur Prüfung auf Einheitlichkeit im DC bewährte sich am besten die organische Phase des Gemisches von Chf-Me-Bz-W-(6:3:1:1). Die Rf-Werte der Flecke entsprachen jeweils ungefähr denjenigen der Purpureaglykoside A und B.

3. *Isolierung von Substanz A.* Bei einer wie unter 1. durchgeführten Verteilungschromatographie, wobei W-gesättigte Chf-Bu-Gemische als mobile Phase verwendet wurden, liess sich ebenfalls keine völlige Auftrennung der KEDDE-(+) Substanzen erzielen, dagegen gelang es, ein in Me sehr schwer lösliches KEDDE(-) Kristalliat zu isolieren, das nach DC einheitlich war. Aus Me-Chf feine Nadelchen: Substanz A, Smp. $207-214^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -22,4^\circ$ [$c = 1,124$ in Chf-Me-(1:1)]. Enzymatische Spaltung: 10 mg in 4 ml W + 1 ml An + 0,1 ml Me suspendiert, mit 2 mg Enzympräparat E. L. 33-63¹¹) versetzt und 16 Std. bei 37° stehengelassen. Danach war im DC neben dem Fleck der sehr polaren Substanz A der Fleck der weniger polaren Substanz a deutlich sichtbar.

4. Schliesslich wurde noch versucht, durch präparative DC eine Auftrennung der Bestandteile des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes zu erzielen. Da die gewanderten Zonen zu nahe aneinander lagen, blieb auch dieser Versuch erfolglos.

Fermentative Spaltung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes. 13 g Rohextrakt wurden mit 400 ml W unter Erwärmen erst mit 100 ml An, dann mit 8 ml Me versetzt, wodurch erst völlige Lösung erreicht werden konnte. Zu dieser gab man 400 mg Fermentpräparat E. L. 33-63¹¹) (gelöst in 5 ml W). Nach Zugabe von 20 Tr. Toluol wurde unter gelegentlichem Umschwenken bei 37° stehengelassen. Schon wenige Minuten nach der Enzymzugabe wurde die Lösung trübe und nach einigen Std. bildete sich ein weisser Niederschlag, der sich mit der Zeit vermehrte. In regelmässigen Abständen wurden kleine Proben der Fermentierungslösung im DC [System Mek (mit W gesättigt)] untersucht, wobei die den Desgluco-Produkten entsprechenden Flecke ständig grösser wurden. Nach 4 Tagen wurden nochmals 110 mg Enzym (in etwas W gelöst) zugegeben. Nach total 10tägigem Fermentieren war der ursprüngliche pH-Wert von 5,5 auf etwa 4,4 abgesunken. Obwohl nach dieser Zeit noch nicht alle Glucosido-Produkte gespalten waren, wurde die Lösung im Vakuum bei 50° auf etwa 200 ml eingengt, zunächst erschöpfend mit jeweils 250 ml Chf und dann noch gründlich mit Chf-Alk-(4:1) extrahiert. Die mit W gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten organi-

schen Phasen wurden filtriert und im Vakuum zur Trockne gebracht. Erhalten wurden: 4,49 g Chf-Extrakt und 5,25 g Chf-Alk-(4:1)-Extrakt. [Die in Chf-Alk-(4:1) löslichen Anteile gaben nach erneuter Fermentierung wiederum mit Chf extrahierbare Desgluco-Produkte, die nach DC dasselbe Substanzgemisch wie nach der 1. Fermentierung enthielten. Sie wurden zum Nachweis von Acetyldigitoxin (4) und Acetylglitaloxin (12) benützt (siehe weiter unten).]

Die erschöpfend mit Chf und Chf-Alk-(4:1) extrahierte wässrige Lösung der Enzymspaltung wurde im RV bei 12 Torr und 50–60° zum Sirup eingedampft (enthält 3,26 g Trockenrückstand). Reduziert FEHLING'sche Lösung. – Nachweis der Glucose als Phenylsazon: eine Probe des Sirups (entsprechend 200 mg Trockensubstanz) wurde mit der Lösung von 0,8 g Phenylhydrazin-hydrochlorid und 1,2 g krist. Na-acetat 10 Min. auf dem Dampfbad erhitzt. Der nach dem Abkühlen erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert und aus Alk umkristallisiert: feine, gelbe Nadelchen von Glucosephenylsazon, Smp. 203–205°. – Versuch zur annähernd quantitativen Ermittlung des Glucosegehaltes: aliquote Anteile des Sirups entsprechend jeweils 115 mg Trockenrückstand wurden mit FEHLING'scher Lösung¹⁸⁾ gekocht, das ausgeschiedene Cu₂O bis zur Gew.-Konstanz geglüht und gewogen: 52 mg bzw. 53 mg CuO (159 mg CuO entsprechen 180 mg Glucose).

Hydrolyseversuche: a) eine Probe des Sirups (entsprechend 700 mg Trockenrückstand) wurde in 15 ml 0,1N H₂SO₄ 90 Min. auf 80–85° erhitzt. Durch Ausschütteln mit Chf liessen sich 15 mg eines braunen, amorphen Rückstandes gewinnen, der KEDDE-(–) war und deshalb nicht weiter untersucht wurde. – b) Eine weitere, gleich grosse Probe des Sirups wurde in analoger Weise, wie unter a) beschrieben, mit 10-proz. H₂SO₄ hydrolysiert und gab 29 mg mit Chf extrahierbares KEDDE-(–) Material.

Untersuchung der Desgluco-Produkte. – 1. *Isolierung von Digitoxin (2).* 5,6 g Chf-Extrakt (aus der Fermentierung) wurden an 120 g SiO₂ chromatographiert. Die Fr 1–8 (mit Chf) enthielten 39 mg KEDDE-(–) Material, die Fr 9–28 [mit Chf-Me-(99:1), -(49:1)+ und -(19:1)] gaben 1,0 g KEDDE-(–) Substanzen, die Fr 29–58 [mit Chf-Me-(9:1) und -(4:1)] 4,2 g KEDDE-(+) Rückstände. Die weiteren Fr (bis reines Me) eluierten nur noch wenig Substanz [KEDDE-(?)]. Die einzelnen Fr wurden in An gelöst und zur Kristallisation eingeengt. Aus den Fr 33–38 konnte ein Kristallinat (288 mg) gewonnen werden, das im DC [System Chf-Me-(9:1) den Rf-Wert des Digitoxins besass und fast einheitlich war. Durch erneute Aufteilung an 4,5 g SiO₂ konnten aus den ersten Fr 172 mg völlig reines Digitoxin vom Smp. 260–264° erhalten werden; $[\alpha]_D^{20} = +15,5^\circ$ ($c = 1,361$ g in Chf mit 0,5-proz. Alk). Auch das spektrale Verhalten (im UV. und IR.) und die Laufstrecke im Pchr (System KAISER I [5]) zeigte völlige Übereinstimmung mit Digitoxin.

2. *Isolierung von Gitaloxin (10).* Die Eindampfrückstände der bei wiederholter chromatographischer Aufteilung von uncinheitlichem Digitoxin an SiO₂ erhaltenen (späteren) Fr, gaben im DC nach Besprühen mit SbCl₃ und Erwärmen den für Digitoxin typischen Fleck, der aber (im Unterschied zum reinen Digitoxin) im UV. ausserdem eine hellblaue Fluoreszenz aufwies (Gitoxigeninderivat). Die Isolierung dieser dem Digitoxin anhaftenden Verunreinigung wurde mit Hilfe der präparativen Pchr wie folgt durchgeführt: 18 cm breite und 48 cm lange Papierbogen (WHATMAN Nr. 1) wurden 3mal durch eine Lösung von Fmd-An-(1:4) gezogen und 15 Min. hingengelassen. Hierauf wurden 106 mg Digitoxin-Mischkristallisat in 2 ml Chf gelöst, und diese Lösung als Band über die ganze Startlinie von 10 imprägnierten Papierbogen gleichmässig verteilt. Entwicklung absteigend im System KAISER I [Xylol-Mek-(1:1), gesättigt mit Fmd], Laufzeit 2½ Std. Nach Trocknen der Papierbogen bei 100° (10 Min.) wurden aus diesen schmale Kontrollstreifen jeweils an den kändern und in der mitte herausgeschnitten, mit SbCl₃ bespruit und erhitzt. An Hand dieser Kontrollstreifen wurden die Papierchromatogramme markiert. Die das Digitoxin enthaltende Zone (unpolarste) sowie die etwas polarere Zwischenzone wurden verworfen. Die polarste Zone wurde herausgeschnitten, die einzelnen Streifen in kleine Schnitzel geschnitten und diese 16 Std. bei 0° in W geweicht. Der Papierbrei wurde dann 4mal mit Chf ausgezogen. Die Chf-Lösungen wurden zur Entfernung des Fmd noch je 3mal mit 100 ml W ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde nochmals in gleicher Weise an 2 Bogen imprägniertem Papier aufgetrennt. Das dann erhaltene Rohprodukt war im Pchr einheitlich und

¹⁸⁾ Diese Methode der Glucosebestimmung ist natürlich nicht spezifisch und gibt zudem nur approximative Werte. Die Vergärungsprobe mit Bäckerhefe ist spezifischer, versagte aber im vorliegenden Fall.

gab aus An-Fe 9 mg völlig reines Gitoxin; Smp. 256–260°. Die Mischprobe mit authentischem Gitoxin¹⁵⁾ (Smp. 249–253°) schmolz bei 252–258°. Verseifung einer kleinen Probe mit verd. NH₃ gab Gitoxin (6), das als einheitlicher Fleck im DC nachgewiesen wurde.

3. *Isolierung von Gitoxin (6) und Nachweis einer polaren Substanz GX*. Die Kristallisate aus den Fr 44–48 der obigen Chromatographie waren nach DC praktisch identisch, aber nicht einheitlich. Sie enthielten zur Hauptsache eine unpolare Substanz, die im DC nach dem Besprühen mit SbCl₅ und Erwärmen einen im UV. lebhaft hellblau fluoreszierenden Fleck [27] mit dem Rf-Wert des Gitoxins gab. Die das Gitoxin enthaltenden Kristallisate (91 mg) wurden mit 6 ml Chf-Me-(19:1) versetzt, erwärmt und von den schwer löslichen Anteilen abfiltriert. Filtrat und Filtrückstand waren nach DC praktisch identisch. Trotzdem wurden nur die löslichen Anteile an 2 g SiO₂ chromatographiert, wobei keine Auftrennung des Gemisches erzielt werden konnte. – Präparative DC: 50 mg des Gemisches wurden jeweils als Band auf 5 Kieselgelplatten [Schichtdicke 1,0 mm enthaltend 0,5% Leuchtpigment LS Super (RIEDEL-DE HAËN AG.)] auf der Startlinie aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte im System Chf-Me-(9:1). Nach dem Trocknen der Platten wurden im UV. die auf hellgrün leuchtendem Grund dunkel erscheinenden Bänder (Zonen) markiert. Das obere Band (= Gitoxin) wurde herausgeschabt und das Kieselgel 2mal mit Chf-Me-(1:1) eluiert. (Zwischen dem unteren und oberen Band wurde eine breite, die anderen Zonen etwas überlappende Mittelzone intakt gelassen, um die in der oberen Zone enthaltene Substanz möglichst einheitlich zu erhalten.) Das Eluat der oberen Zone wurde aus Me-Chf kristallisiert und gab 7 mg im DC völlig einheitliches Gitoxin; Smp. 268–273°; Mischprobe mit authentischem Gitoxin 268–274°. Auch die Rf-Werte im Pchr stimmten mit diesem völlig überein. – Das aus der unteren Zone isolierte Material enthielt zur Hauptsache die polare Substanz GX.

Fermentierungsversuch der Lanatoside A und B. Je 1 mg Lanatosid A und B wurden unter den gleichen Bedingungen fermentiert wie der oben beschriebene Chf-Alk-(4:1)-Extrakt. Die Fermentierungsprodukte enthielten nach DC nur die Acetylverbindungen der Desglucolanoside A und B (= Acetyldigitoxin (4) und Acetylgitoxin (8)).

Nachweis von Acetyldigitoxin (4) und Acetylgitoxin (12). Als Untersuchungsmaterial wurden die 2,3 g Desgluco-Produkte (in Chf lösliche Anteile) verwendet, die durch Nachfermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes (= 4,84 g, siehe Tab. 2) der 1. Fermentierung (siehe oben) erhalten worden waren. Durch Chromatographie an 25 g SiO₂ wurde das Gemisch in 32 Fr aufgeteilt. Aus dem Verdampfungsrückstand von 2 Fr [mit Chf-Me-(96,5:3,5)] konnten aus An 18 mg Kristalle erhalten werden, die nach DC in verschiedenen Systemen einheitlich zu sein schienen. Im Pchr (System KAISER I) gaben diese Kristalle aber 2 Flecke, deren Rf-Werte denjenigen des Acetyldigitoxins (4) und Acetylgitoxins (12) entsprachen. Das durch Verseifung einer Probe des Mischkristallisates in verd. wässrig-methanolischem NH₃ erhaltene Produkt gab im DC (System Chf-Me-(9:1)) und Pchr (System KAISER I) Flecke, deren Rf-Werte denjenigen des Digitoxins (2) und Acetylgitoxins (8) bzw. Gitoxins (6) entsprachen.

Isolierung von Substanz a nach Fermentierung. Nach Chromatographie an SiO₂ des Chf-Auszugs (0,4 g) der 2. Nachfermentierung (2,3 g, siehe Tab. 2) liess sich nach Eindampfen von 4 Fr [Chf-Me-(19:1)] 53 mg einer im DC einheitlichen Substanz gewinnen, die aus An-Me 30 mg feine Nadelchen vom Smp. 204–210° gab. Durch erneute chromatographische Aufteilung konnte schliesslich der Smp. auf 241–246° gebracht werden. $[\alpha]_D = -23^\circ$ [$c = 1,00$ in Chf-Me-(1:1)]. Die Molekulargewichtsbestimmung (in An, Einwaage ca. 1 mg) mit dem MECHROLAB Osmometer gab den Wert 697 ± 45 .

C₃₅H₆₀O₁₂ (684,8) Ber. C 63,14 H 8,92 O 28,04% Gef. C 63,13 H 8,83 O 27,71%

ZUSAMMENFASSUNG

Aus den getrockneten Blättern von *Digitalis obscura*, deren Toxizität (an der Katze nach HATCHER-MAGNUS) rund 2mal höher ist als die des Internationalen *D. purpurea*-Standards, konnten die folgenden «genuinen» Glykoside isoliert werden: α - und β -Acetyldigitoxin sowie Lanatosid A. Ein beim Ausschüttlungsverfahren gewonnener Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt, der rund 70% der Gesamtoxizität in sich vereinigte, wurde auf enzymatischem Wege partiell abgebaut. Danach konnten

die folgenden Desgluco-Produkte in Kristallen isoliert werden: Digitoxin, Gitoxin, Gitaloxin, Acetyldigitoxin und Acetylitaloxin. Damit kann das mit Hilfe der Papierchromatographie in den Blättern wahrscheinlich gemachte Vorkommen der Lanatoside A, B und E, des Glucogitaloxins, der Purpureaglykoside A und B sowie des Glucogitorosids als gesichert gelten.

Ein als Begleitsubstanz des Gitoxins auftretendes vorläufig als GX bezeichnetes Gitoxigenin-(?)-glykosid konnte nur stark angereichert erhalten werden. Es liess sich nicht mit einem bekannten Glykosid identifizieren.

Da Digoxigeninglykoside in *Digitalis obscura* nicht nachgewiesen werden konnten, nimmt diese in bezug auf die chemische Zusammensetzung ihrer Glykoside eine Mittelstellung zwischen *D. purpurea* L. und *D. lanata* EHRH. ein.

Neben den genannten für *Digitalis*-Arten typischen Inhaltsstoffen wurden zwei unbekannte Glykoside isoliert, die nicht zu den Cardenolid- und vermutlich auch nicht zu den Digitanol-Glykosiden oder den Saponinen zu zählen sind. Sie werden vorläufig als Substanz A bzw. Substanz a (Desgluco-Produkt von A) bezeichnet. Substanz a ist möglicherweise identisch mit dem «Obscuraglykosid» von NOVELLA & LONZANO [2].

Über die in *D. obscura* aufgefundenen – zumindest für die Gattung *Digitalis* – neuen Pflanzenpigmente wird in anderem Zusammenhang ausführlich berichtet werden¹⁹⁾.

Pharmazeutisches Institut der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. WERNER, Wissenschaftl. Zeitschr. d. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Mathem.-Naturw. Reihe 13, 453 (1964).
- [2] E. C. NOVELLA & V. S. LONZANO, Anales real. Soc. españ. Fisica Quim. (Madrid) 48 B, 893 (1952); Chem. Abstr. 47, 12755e (1953).
- [3] V. S. LONZANO & E. C. NOVELLA, Anales real. Soc. españ. Fisica Quim. (Madrid) 50 B, 315, 679 (1954); Chem. Abstr. 49, 5503b bzw. 445i (1955).
- [4] D. L. KEDDE, Diss. Leiden 1946; Pharmac. Weekbl. 82, 741 (1947); vgl. auch J. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, Biochem. J. 52, 643 (1952). Ausgeführt als Tüpfelprobe auf Papier.
- [5] F. KAISER, Chem. Ber. 88, 556 (1955).
- [6] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 18, 120 (1935); 37, 1134 (1954).
- [7] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 16, 1049 (1933).
- [8] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 16, 1390 (1933).
- [9] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 17, 592 (1934); 35, 1318 (1952); R. TSCHESCHE & B. NYOM-PORN & H. MACHLEIDT, Chem. Ber. 92, 2258 (1959).
- [10] A. WINDAUS, G. WESTPHAL & G. STEIN, Ber. deutsch. chem. Ges. 61, 1847 (1928).
- [11] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 17, 592 (1934); 35, 1318 (1952).
- [12] E. HAACK, M. GUBE, F. KAISER & H. SPINGLER, Chem. Ber. 91, 1758 (1958).
- [13] E. HAACK, F. KAISER & H. SPINGLER, Naturwiss. 42, 441 (1955); *idem*, Chem. Ber. 89, 1353 (1956).
- [14] E. ANLIKER, F. BARFUSS & J. RENZ, Helv. 41, 479 (1958); vgl. Diss. D. KUTTER, Lausanne 1957.
- [15] E. HAACK, F. KAISER, M. GUBE & H. SPINGLER, Naturwiss. 45, 315 (1958).
- [16] F. KAISER, E. HAACK & H. SPINGLER, Liebigs Ann. Chem. 678, 137 (1964).
- [17] M. PESEZ, Ann. pharmac. franç. 10, 104 (1952) und frühere Lit. daselbst.

¹⁹⁾ Anmerkung bei der Korrektur: CARRERAS [28] hat vor kurzem, was wir leider übersehen haben, mit Hilfe der Papierchromatographie das Vorliegen der folgenden Glykoside in *D. obscura* wahrscheinlich gemacht: Lanatosid A und B, Purpureaglykosid A und B, Digitoxin, Gitoxin, Gitaloxin, Olorosid G, Digitalinum verum, Strospezid und Verodoxin.

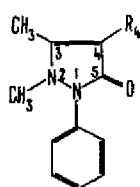
- [18] V. CALCANDI, I. CALCANDI & J. LUNGEANU, *Naturwiss.* 50, 498 (1963); V. CALCANDI & J. LUNGEANU, *ibid.* 57, 242 (1964).
 [19] T. REICHSTEIN & J. VON EUW, *Helv.* 21, 1181 (1938); H. ROSENMUND & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.* 17, 176 (1942).
 [20] O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 108 (1951).
 [21] A. STOLL, E. ANLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL & J. RENZ, *Helv.* 34, 1460 (1951).
 [22] J. VON EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 33, 666 (1950); W. RITTEL, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 35, 434 (1952).
 [23] E. HAACK, F. KAISER & H. SPINGLER, *Naturwiss.* 43, 130 (1956); 45, 241 (1958).
 [24] A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 33, 76 (1950).
 [25] E. HAACK, F. KAISER, M. GUBE & H. SPINGLER, *Naturwiss.* 43, 301 (1956).
 [26] A. GAMP, P. STUDER, H. LINDE & K. MEYER, *Experientia* 18, 292 (1962).
 [27] M. PESEZ, *Ann. pharmac. franç.* 8, 746 (1950).
 [28] L. CARRERAS, *Farmacognosia (Madrid)* 23, 1 (1963); *Chem. Abstr.* 67, 6042h (1964).

31. Synthese und pharmakologische Eigenschaften einiger Pyridyl-pyrazol-5-one

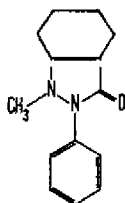
von J. Büchi, P. Fabiani, H. U. Frey, A. Hofstetter und A. Schorno

(7. X. 65)

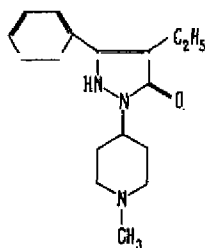
A. Einleitung. – Seit KNORR [1] im Jahre 1883 das *Antipyrin*[®] (1-Phenyl-2,3-dimethyl-pyrazol-5-on) hergestellt und damit ein Antipyreticum von ausgezeichneter Wirkung gefunden hat, ist eine Vielzahl von Pyrazol-5-on-Derivaten synthetisiert worden, von denen allerdings nur wenige eine Bedeutung als Arzneimittel erlangt haben, so die folgenden Antipyretica und Analgetica:



I	$R_4:$ -H	Antipyrin [®] (HOECHST)
II	$R_4:$ -CH(CH ₃) ₂	Larodon [®] (ROCHE)
III	-N(CH ₃) ₂	Pyramidon [®] (HOECHST)
IV	-NH-SO ₃ Na	Melubrin [®] (HOECHST)
V	-N-SO ₃ Na CH ₃	Novalgin [®] (HOECHST)



VI
Tenagin[®] (BEIERSDORF)



VII
Piperylon (SANDOZ)