

obtenu (à partir de l'azolactone pure) par *Gränacher* et *Mahler*¹⁾ qui l'ont purifié par cristallisation dans un mélange d'alcool méthylique et d'éther. Leur produit fondait à 140—142° (non corr.).

Action de NaOH 1,0-n.:

Un mélange de 1,10 gr. (0,005 mol) de méthylamide et de 20,0 cm³ de NaOH 1,0-n. (4 équivalents) fut chauffé à l'ébullition. A cette température, la méthylamide se dissout entièrement dans l'alcali. Elle subit une saponification qui est lente à s'effectuer; la méthylamine libérée s'échappe par l'orifice du réfrigérant. L'opération fut interrompue après 30 minutes. La solution fut refroidie, mais l'alcali ne fut pas neutralisé (!). La cristallisation fut amorcée. Les cristaux furent séparés après glaçage et lavés avec le moins possible d'eau glacée (où ils sont très solubles). Ils furent séchés dans le vide sur du pentoxyde de phosphore. Le produit obtenu était de la méthylamide car:

4,941 mgr. subst. ont donné 11,830 mgr. CO₂ et 3,240 mgr. H₂O

C ₁₂ H ₁₆ O ₂ N ₂ (220,14)	Calculé C 65,41	H 7,32%
	Trouvé „ 65,30	„ 7,34%

Je termine ces 4 mémoires en exprimant ma profonde reconnaissance à M. *P. Lecomte du Noüy* pour l'excellent accueil qu'il m'a fait dans son service, pour toutes les facilités de travail qu'il m'y a accordées et le bienveillant intérêt qu'il me témoigne.

Paris, Institut Pasteur, Service de Biophysique Moléculaire.

64. Acetyldigitoxin, Acetylgitoxin und Acetyldigoxin

(5. Mitteilung über Herzglucoside²⁾)

von **Arthur Stoll** und **Walter Kreis**.

(26. III. 34.)

Theoretische Übersicht.

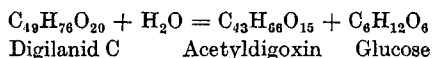
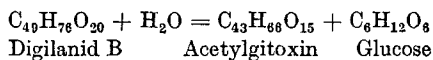
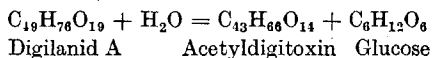
Beim partiellen Abbau der Digilanide³⁾ mit schonenden Mitteln bis zur Digitoxinstufe, deren Repräsentanten noch aus einer Aglucon- und drei Digitoxosemolekeln bestehen, verlieren die genuinen Glucoside bei milder Alkalibehandlung 1 Mol. Essigsäure und durch glykolytische Enzyme 1 Mol. Traubenzucker. Die chemischen und die enzymatischen Spaltungsreaktionen können getrennt durchgeführt werden und führen zu wohl definierten Zwischenstufen. In unserer vorhergehenden 4. Mitteilung wurden die Abspaltung des Acetyls

¹⁾ *C. Gränacher* et *M. Mahler*, *Helv.* **10**, 262 (1927).

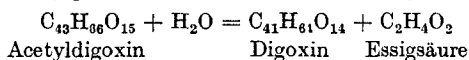
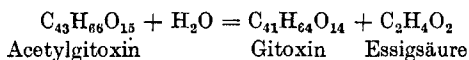
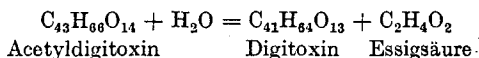
²⁾ 4. Mitteilung: *Helv.* **16**, 1390 (1933).

³⁾ Vorläufige Mitteilungen: *A. Stoll* und *W. Kreis*, *Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges.* **1932**, 331 und 435; *A. Stoll*, „Ein Gang durch biochemische Forschungsarbeiten“, Berlin 1933; *A. Stoll* und *W. Kreis*, *Münchn. Med. Wochenschr.* **80**, 723 (1933); *C. r.* **196**, 1742 (1933); *Bull. Sci. pharmacol.* **40**, 321 (1933). Vgl. auch *Helv.* **16**, 1049 (1933) *Z. physiol. Ch.* **222**, 25 (1933); *Helv.* **16**, 1390 (1933).

und die dabei entstehenden Desacetyldigilanide A, B und C beschrieben, die alsdann auf enzymatischem Wege glatt in die um 1 Mol. Glucose ärmeren Glucoside, das Digitoxin, bzw. das Gitoxin und das Digoxin übergeführt werden konnten. In der vorliegenden Arbeit werden die Versuche zur enzymatischen Abspaltung der Glucose aus den Digilaniden unter Erhaltung der Acetylgruppe und die zum ersten Male in Substanz isolierten Acetylglucoside: das Acetyldigitoxin, das Acetylgitoxin und das Acetyldigoxin beschrieben. Die Enzyme frischer oder sorgfältig getrockneter Digitalisblätter, die Digilanidase und die Digipurpidase, spalten unter geeigneten Bedingungen aus den Digilaniden glatt 1 Mol. Glucose ab nach folgenden Gleichungen:



Durch gelinde Alkalibehandlung lässt sich die Acetylgruppe leicht so abspalten, dass die wohlbekanntenen Glucoside Digitoxin, Gitoxin und Digoxin in sehr guter Ausbeute entstehen nach folgenden Gleichungen:



Die beiden Wege des partiellen Abbaus, die wir in unserer 2. Mitteilung¹⁾ schematisch dargestellt haben und die unter Erhaltung der physiologischen Wirksamkeit von den genuine Glucosiden, den Digilaniden A, B und C zu Digitoxin, Gitoxin, Digoxin führen, sind somit präparativ bearbeitet und analytisch belegt worden, so dass unsere Untersuchungen in bezug auf die Hauptreaktionen dieses partiellen Abbaus mit der vorliegenden Abhandlung zu einem gewissen Abschluss gebracht sind.

Bei der enzymatischen Abspaltung der Glucose, die wir in der vorliegenden Arbeit zunächst allein erstrebten, war es nicht möglich, Nebenreaktionen ganz auszuschliessen. Durch die notwendige längere Berührung der Digilanidlösungen mit dem Enzymmaterial, das trotz möglichst erschöpfender Vorextraktion noch sehr komplexer Natur ist, können Reaktionen auch anderer Art katalytisch beschleunigt werden. Schon die erste Darstellung des Digoxins

¹⁾ Helv. 16, 1052 (1933).

durch *S. Smith*¹⁾ aus Blättern der *Dig. lanata* zeigt, dass ohne besondere Vorsichtsmassnahmen zur Verhinderung von Enzymreaktionen aus dem in den Blättern primär vorhandenen Glucosid, dem Digilanid C, leicht Glucose und Acetyl abgespalten werden können. In Bestätigung dieser Erfahrung haben wir selbst beobachtet, dass unter gewissen Versuchsbedingungen, auf die wir hier nicht eingehen können, gleichzeitig mit dem Glucoserest auch Acetyl verloren gehen kann, so dass die Zwischenstufen, die Acetylglucoside, nur in geringer Ausbeute oder gar nicht mehr gefasst werden können.

Wir sind in der vorliegenden Untersuchung noch einer andersartigen Umwandlung der Glucoside begegnet, welche die Isolierung der Acetylglucoside nach der enzymatischen Abspaltung der Glucose anfänglich sehr erschwert hat. Es treten nämlich sowohl Acetyldigitoxin, wie Acetylgitoxin und Acetyldigoxin unter unseren Versuchsbedingungen je in 2 optisch isomeren Formen auf. Diese Isomerie ist sehr wahrscheinlich durch eine Stereoisomerie am Zuckeranteil der Molekeln, an der vielleicht auch die Acetylgruppe beteiligt ist, bedingt. Die Entfernung der Acetylgruppe durch eine milde und kurze Alkalibehandlung führt von beiden optischen Isomeren zu genau denselben desacetylierten Verbindungen Digitoxin, bzw. Gitoxin und Digoxin.

Die von uns bei den Acetylglucosiden aufgefundene Isomerie ist daher verschieden von der von *Jacobs*²⁾ bei kombé-Strophanthin beobachteten Allomerisierung durch Enzyme, da unsere Isomeren sich anscheinend nur in den Zuckerkomponenten unterscheiden, während *Jacobs* durch Hydrolyse des allomerisierten Produktes ein „Allostrophanthin“, also ein verändertes Aglucon, erhalten hat. Über die Ursachen der Bildung unserer Isomerenpaare besitzen wir noch keine sicheren Anhaltspunkte.

Die beiden Formen der 3 Paare von Acetylglucosiden unterscheiden sich vor allem in ihrer optischen Aktivität. Wir haben Anhaltspunkte dafür, dass die Verbindungen mit geringerer optischer Drehung die primären und labileren Formen sind, aus denen die stabileren Isomeren mit stärkerer Drehung entstehen. Wir bezeichnen daher die Acetylglucoside mit der schwächeren optischen Aktivität als α -Formen, diejenigen mit stärkerer Drehung als β -Formen. Parallel mit der Verschiedenheit in der optischen Drehung gehen Unterschiede in der Löslichkeit und in der Krystallform, so dass sich α - und β -Form voneinander durch fraktionierte Krystallisation trennen lassen. Wir haben bisher diese Trennung in präparativem Masstab nur bei den Derivaten des Digilanids C vollständig durchgeführt und beschreiben im experimentellen Teil neben der Isolierung der beiden Formen des Acetyldigoxins auch

¹⁾ Soc. 1930, 508.

²⁾ J. Biol. Chem. 88, 519 (1930).

ihre Eigenschaften und ihre Desacetylierung zu identischem Digoxin. Die β -Formen von Acetyldigitoxin und Acetylgitoxin sind ebenfalls isoliert und beschrieben, während ihre α -Isomeren noch nicht in genügender Reinheit dargestellt wurden. Es ist wohl möglich, dass ihre Reindarstellung leichter gelingt, wenn wir die Bedingungen des enzymatischen Versuchs, wie wir sie bei der Glykolyse des Digilanids C angewandt haben, auch auf Digilanid A und Digilanid B übertragen. Wir benützten nämlich für die Glucoseabspaltung aus Digilanid C ein Enzymmaterial, das aus frischen Dig. lanata-Blättern hergestellt war, und eine geringere Alkoholkonzentration als in unseren Versuchen mit den Komponenten A und B, wo wir in stärkerem Alkohol mit Enzymmaterial aus vorgängig getrockneten Lanatablättern gearbeitet haben.

Merkwürdigerweise besitzen Acetyldigoxin α und β trotz ihrer konstitutionellen Unterschiede, ihrer verschiedenen Löslichkeit und Krystallform dieselbe Toxicität bei der Katze. Eine Katzeinheit entspricht bei Acetyldigoxin α : 0,36 mg, bei Acetyldigoxin β : 0,375 mg, während der vergleichsweise ermittelte Wert von reinem Digoxin 0,29 mg für die Katzeinheit betragen hatte. Aus orientierenden Versuchen scheint hervorzugehen, dass auch Acetyldigitoxin α und β eine ähnliche oder gleiche Toxicität besitzen¹⁾.

Die oben erwähnte Möglichkeit einer Abspaltung von Acetyl und Glucose, wie sie bei der Isolierung von Digoxin nach *Smith* stattfinden muss und die nun festgestellte Bildung von optisch isomeren Acetylglucosiden zeigen einmal mehr, wie mannigfaltigen Veränderungen die genuinen Glucoside bei langsamer Verarbeitung enzymhaltigen Materials unterliegen können. Wir glauben mit Recht annehmen zu können, dass diesen Umständen von früheren Autoren nicht immer genügend Rechnung getragen wurde. Die Isolierung von Digitoxin, von Gitoxin und Digoxin, die bis vor kurzem als primäre Produkte der Digitalisblätter betrachtet wurden, beweist das.

Wir sehen uns veranlasst, auch einen Vorbehalt zu der Auffassung von *C. Mannich* zu machen, der in seiner kürzlich erschienenen Abhandlung²⁾ seine früher zusammen mit *P. Mohs* und *W. Mauss* beschriebenen Lanatagluco-side I, II und III³⁾ als genuine Glucoside betrachtet und beispielsweise annimmt, dass sein Lanatagluco-sid II dasselbe sei, wie unser Digilanidgesamtpräparat, das er daher vor uns in Händen gehabt hätte. Letzteres ist schon deswegen unrichtig, weil die Darstellung unseres Digilanidgesamtpräparates, wie *Mannich* selbst zitiert, bereits am 1. März 1930 zum deutschen Patent an-

¹⁾ Wir verdanken die physiolog. Wirksamkeitsbestimmungen Dr. *E. Rothlin*, Leiter unserer pharmakologischen Abteilung.

²⁾ Arch. Pharm. B. deutsch. pharm. Ges. **272**, 5 (1934).

³⁾ Arch. Pharm. B. deutsch. pharm. Ges. **268**, 453 (1930).

gemeldet wurde, während er und seine Mitarbeiter erst im Herbst 1930 über ihr Lanataglucon II veröffentlichten.

Greift man überdies den von *Mannich* und seinen Mitarbeitern s. Z. für das Lanataglucon II ermittelten Aglucongehalt¹⁾, der sich erfahrungsgemäss bis auf 1% genau bestimmen lässt, heraus, so erhält man ohne Berücksichtigung des sonst üblichen Chloroformauszuges aus der Agluconmutterlauge schon einen Agluconwert, der weit über dem Aglucongehalt von Digitalisglucosiden liegt, die, wie die Digilanide, 3 Digitoxose, 1 Glucose und 1 Acetylgruppe enthalten. *Mannich's* Lanataglucon II musste daher mit einem hohen Prozentsatz von zuckerärmeren Glucosiden, als es die Digilanide sind, vermischt gewesen sein. Die Komponententrennung nach der von uns in der 2. Mitteilung beschriebenen Methode führt natürlich nur zu einwandfreien Ergebnissen, wenn die Digilanide unversehrt und frei von fremden Beimischungen vorliegen, worauf wir in bezug auf den quantitativen Vergleich des Komponentenverhältnisses, den *C. Mannich*²⁾ durchführt, hinweisen möchten.

Im übrigen ging aus den ersten Untersuchungen von *C. Mannich, Mohs* und *Mauss* nicht hervor, dass das Lanataglucon II ein Gemisch darstelle, das man in Komponenten zerlegen könne, wie es *C. Mannich* in seiner letzten Arbeit nun angibt. Es ist ihm und seinen Mitarbeitern in eingehenden Versuchen nicht möglich gewesen, das Lanataglucon II durch fraktionierte Krystallisation in verschiedene Komponenten zu zerlegen³⁾. Den Schluss, dass die isomorphe Krystallisation des Digilanid-Gesamtpräparates ein Gemisch aus mehreren Glucosiden sei, haben wir jedenfalls nicht aus diesem ganz negativen Versuch gezogen, sondern wie wir in unserer 2. Mitteilung⁴⁾ gezeigt haben, auf Grund ganz anderer, eigener Beobachtungen und Überlegungen. Im übrigen haben wir das Lanataglucon II von *Mannich* immer für eine von unserem Digilanidgesamtpräparat verschiedene Substanz gehalten, so dass wir aus Vermutungen, die dieser Autor über die Zusammensetzung seines Präparates, ohne sie beweisen zu können, geäussert hat, keine Schlüsse in bezug auf Digilanid (A + B + C) ziehen konnten, wie *Mannich* jetzt annehmen möchte⁵⁾.

Wir haben in unserer 2. Mitteilung⁶⁾ auf erhebliche Unterschiede in den analytischen Befunden und ihrer Interpretation von *C. Mannich, Mohs* und *Mauss* gegenüber unseren eigenen Ergebnissen hingewiesen, und es dürfte einem Unbeteiligten schwer fallen, in den ursprünglichen Angaben, die *C. Mannich* und seine Mitarbeiter

¹⁾ loc. cit. S. 467—468.

²⁾ Arch. Pharm. B. deutsch. pharm. Ges. **272**, 6 (1934).

³⁾ Arch. Pharm. B. deutsch. pharm. Ges. **268**, 457 und 469 (1930).

⁴⁾ Helv. **16**, S. 1053 u. ff. (1933).

⁵⁾ Arch. Pharm. **272**, 6/7 und Fussnote 7 (1934).

⁶⁾ Helv. **16**, 1058 (1933).

über ihre Glucoside gemacht haben, die chemischen Merkmale, die sie nach Kenntnis unserer Arbeiten ihren heutigen Präparaten zuschreiben, zu erkennen.

In bezug auf das Lanataglucosid I, das Lanadigin von *Mannich*, müssen wir entgegen der neuesten Mitteilung von *Mannich*, wir hätten dieses Glucosid mit unserem Digilanid C für übereinstimmend angegeben, darauf hinweisen, dass wir auf Grund der Gegenüberstellungen der analytischen Befunde annehmen mussten, dass die beiden Glucosidpräparate nicht identisch sein können¹⁾. *C. Mannich* nimmt übrigens in seiner neuesten Arbeit²⁾ an, dass sein früher beschriebenes Lanadigin nicht unbeträchtliche Mengen der Digilanide A und B enthalten habe. Es wird indessen in der Literatur eine nicht geringe Verwirrung entstehen, wenn *C. Mannich* das Lanadigin, das von ihm bisher als chemisch einheitlicher Stoff³⁾ — neuerdings identisch mit Digilanid C — betrachtet wurde, nun auf einmal als ein Gemisch der Digilanide A, B und C bezeichnet, das nur 75%, andernorts sogar nur 45% Digilanid C enthalten soll⁴⁾. Wenn nun selbst Lanadigin (= Lanataglucosid I) keine einheitliche Substanz mehr ist, so ist anzuzweifeln, ob *C. Mannich*, *Mohs* und *Mauss*⁵⁾ in ihrer ausführlichen ersten Arbeit über die Glucoside der *Dig. lanata* überhaupt ein reines Glucosid isolieren und zur Analyse bringen konnten.

Wie bereits erwähnt, sind die wichtigsten Versuche der vorliegenden Arbeit, nämlich die Abspaltung der Glucose aus den Digilaniden enzymatischer Art. Wir werden darauf im experimentellen Teil näher eingehen, soweit es für diese präparative Arbeit nötig ist. Über die eigentlichen Enzymversuche, die über die Natur der Digilanidase und der Digipurpidase Anhaltspunkte geben sollen, wird in einer besonderen Abhandlung a. a. O. berichtet werden. Im übrigen lehnte sich unsere Versuchstechnik weitgehend an frühere Arbeiten auf dem Gebiet der Herzglucoside an.

Im Gegensatz zu den in der 4. Mitteilung beschriebenen Desacetyldigilaniden, von denen nur die Komponente C krystallisierte, sind Acetyldigitoxin, Acetylgitoxin und Acetyldigoxin (α und β) sehr schön krystallisierende Stoffe. Wir haben sie in der Tafel (Figur 1

¹⁾ Helv. 16, 1058 (1933). ²⁾ loc. cit. S. 7.

³⁾ Arch. Pharm. B. deutsch. Pharm. Ges. 268, 453 (1930).

⁴⁾ Wir lesen in der Fussnote der Arbeit von *C. Mannich*, Arch. Pharm. B. deutsch. pharm. Ges. 272, 8 (1934): „Auf meine Veranlassung hin hat die Firma *P. Beiersdorf & Co. A.-G.* Hamburg, welche das Lanadigin fabrikmässig herstellt, Präparate verschiedenster Herstellung nachgeprüft. Dabei hat sich die Anwesenheit der Digilanide A und B bestätigt. Jedoch ist das Mischungsverhältnis der drei Glykoside in den Präparaten aus verschiedenen Chargen das gleiche; das war auf Grund der Tatsache, dass dort nach einem festgelegten Verfahren gearbeitet wird, zu erwarten. Nach den dort ausgeführten Analysen besteht dieses Lanadigin aus rund 30% Digilanid A, 25% Digilanid B und 45% Digilanid C.“

⁵⁾ loc. cit.

bis 4) abgebildet und gleichsam als Nachtrag noch die Krystallbilder von Desacetyldigilanid C (Fig. 5), das wir in der vorhergehenden Mitteilung allein nicht bringen wollten und von Digoxin (Fig. 6) dessen charakteristische Krystallformen unseres Wissens bisher noch nicht abgebildet wurden, beigelegt.

Es fällt auf, dass die β -Formen der neuen Acetylglucoside so ähnlich krystallisieren, dass man an einen Krystallisomorphismus wie bei den Digilaniden, wenn auch nicht so ausgeprägt, denken musste. Da die traubenzuckerfreien Acetylglucoside β auch ähnlich wie die Digilanide krystallisieren, so dürfte es schwer sein, diese beiden Gruppen von Glucosiden voneinander zu trennen, wenn Gemische entstehen sollten, z. B. bei einer unvollständigen enzymatischen Glykolyse. Der grosse Unterschied in der Krystallform der beiden optischen Isomeren α und β des Acetyldigoxins ist indessen frappant.

Dass die Acetylgruppen in unseren Präparaten bei der enzymatischen Abspaltung der Glucose tatsächlich erhalten geblieben sind, geht aus dem Laugenverbrauch bei der sogenannten Lactontitration hervor, der doppelt so gross ist, als er für die Öffnung des Lactonrings allein nötig wäre; die eine Hälfte ist eben für die Verseifung der Acetylgruppe verbraucht worden.

Aus unseren Versuchen geht ferner eindeutig hervor, dass das Acetyl in den genuinen Glucosiden, den Digilaniden, nicht an der Glucose sitzen kann, sonst hätte es bei der milden enzymatischen Behandlung mit dem Traubenzucker abgespalten werden müssen. Das Acetyl sitzt wahrscheinlich an einer Digitoxosemolekel, und zwar an derjenigen, die bei der sauren Hydrolyse als Digilanidobiose abgespalten wird und daher im Digilanid die Glucose trägt. Die Isolierung des Disaccharids, das bekanntlich aus Digitoxose und Glucose besteht, gelingt nämlich leichter, wenn die Acetylgruppe aus den Digilaniden vorgängig der sauren Hydrolyse durch milde Alkalibehandlung entfernt worden war¹⁾. Der eindeutige Beweis für die Bindung des Acetyls an Digitoxose würde natürlich am besten durch die Isolierung der Acetyl-digilanidobiose erbracht.

Experimenteller Teil.

1. Allgemeines zur Darstellung der neuen Glucoside.

Der zuerst beschrittene Weg zur Gewinnung von Acetyldigitoxin lehnte sich an das Verfahren zur Darstellung von Proscillaridin A aus frischen Meerzwiebeln an²⁾. Frische Blätter der *Digitalis lanata* wurden fein zerkleinert, mit Essigester überschichtet und 3 Tage bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Die genuinen Digilanide A, B und C verloren dabei unter dem Einfluss des frei gelegten

¹⁾ Vgl. dazu unsere 4. Mitteilung, Helv. 16, 1393 (1933).

²⁾ Helv. 16, 729 (1933).



Fig. 1. Acetyldigitoxin β (oben: aus wässrigem Methanol, unten: aus Methanol, langsam gewachsener Krystall)

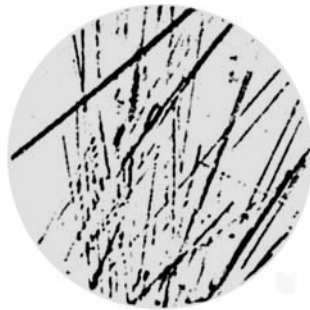


Fig. 2. Acetylgitoxin β (aus wässrigem Methanol)



Fig. 3. Acetyldigoxin α (aus Chloroform-Methanol-Äther)



Fig. 4. Acetyldigoxin β (aus wässrigem Methanol)



Fig. 5. Desacetyldigilanid C (aus wasserhaltigem Methanol)



Fig. 6. Digoxin (aus verdünntem Alkohol)

Enzyms je 1 Mol Glucose und gingen in die entsprechenden glucosefreien Verbindungen: Acetyldigitoxin, Acetylgitoxin und Acetyldigoxin über. Nach 3 Tagen wurde der überstehende Essigester abgossen und für die eigentliche Extraktion der Glucoside beiseite gestellt. Den nassen Blattbrei sättigten wir nun mit Ammoniumsulfat, um die Glucoside auszusalzen und pressten ihn hydraulisch ab. Der Pressrückstand wurde hierauf wie bei der Gewinnung des Digilanids¹⁾ mit Essigester extrahiert, wobei der vorher zur Überschichtung des Breies während der enzymatischen Spaltung gebrauchte Essigester mitverwendet wurde. Den durch Filtration geklärten, tiefgrünen Essigesterauszug, der neben den Blattfarbstoffen noch andern Ballast enthält, dampften wir im Vakuum bei niedriger Temperatur vorsichtig zur Trockne und behandelten den Eindampfrückstand mit viel Äther. Zum Unterschied gegenüber der Darstellung der genuinen Digilanide, die in Äther ungelöst bleiben, gingen die enzymatisch abgebauten Glucoside zum überwiegenden Teil in den ätherischen Auszug über. Diese Beobachtung entspricht der von uns allgemein beobachteten Regel, dass die Löslichkeit der Glucoside in mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Essigester und Äther) mit der Abspaltung der Glucose zunimmt, so auch beim Übergang von Scillaren A in Proscillaridin A oder von Desacetyldigilanid A in Digitoxin. Die entglucosierten Digilanide als „Tannoide“ sind also im vorliegenden Reinheitsgrade in Äther erheblich löslich. Diese Löslichkeit geht indessen mit steigender Reinheit sehr stark zurück, so dass die Substanzen in reinstem Zustand fast ätherunlöslich sind.

Wir benützten also die Ätherlöslichkeit des Rohproduktes für die Abtrennung der Acetylglucoside von einem Teil der Begleitstoffe und kochten mehrmals mit Äther aus. Die gesammelten ätherischen Lösungen wurden im Vakuum bei niedriger Temperatur vollständig eingedampft. Den Rückstand digerierten wir zur weiteren Reinigung gründlich und erschöpfend mit Petroläther, der die Glucoside ungelöst lässt, jedoch viel Begleitstoffe, wie Chlorophyll, Carotinoide, Phytosterine u. a. aufnimmt. Das so gewonnene „Reintannoid“ lösten wir in Methanol-Wasser 1:1 und unterwarfen es in bekannter Weise einer Behandlung mit unlöslichem Gerbstoff-fällungsmittel, filtrierten und dampften die Lösung im Vakuum bei niedriger Temperatur auf ein kleines Volumen ein, wobei sich die Glucoside ausschieden und abfiltriert werden konnten. Man krystallisierte sie unter Zusatz von Tierkohle aus verdünntem Alkohol um und erhielt verschiedene Krystallfraktionen, die aber nicht einheitlich waren. Die bei den Digilaniden so auffallende, strenge Krystallisomorphie war verloren gegangen. Trotzdem gestaltete sich die

¹⁾ Helv. 16, 1062 (1933).

Trennung in die Einzelkomponenten A, B und C äusserst schwierig. Am besten liess sich durch fraktionierte Krystallisation und fraktioniertes Auflösen in verschiedenen Lösungsmitteln die Komponente A (Acetyldigitoxin) isolieren, und zwar auf Grund ihrer Leichtlöslichkeit in Chloroform, während die Reindarstellung der Komponenten B und C aus dem Gemisch der traubenzuckerfreien Acetylglucoside nie vollständig gelang. Wir liessen es bei einer Anreicherung von Acetylgitoxin und Acetyldigoxin in einzelnen Fraktionen bewenden, da inzwischen ihre Reindarstellung auf anderem Wege erreicht wurde, nämlich ausgehend von den einheitlichen Digilaniden A, B und C und Abspaltung des Glucoserestes mit aus Digitalisblättern hergestellten Enzympräparaten. Im folgenden soll der Kürze wegen nur dieser Weg ausführlich beschrieben werden.

Herstellung der Enzympräparate.

a) Aus getrockneten Blättern. Frische Blätter der *Dig. lanata* wurden vorsichtig und ohne die Temperatur von 45° zu überschreiten getrocknet; das Material behielt dabei eine recht kräftige enzymatische Wirksamkeit. Um die in den Blättern primär enthaltenen Glucoside zu entfernen, wurden sie einer Vorextraktion unterzogen, die darin bestand, dass man z. B. 500 g trockene, fein pulverisierte Blätter mit 2500 cm^3 eines Gemisches von 5 Volumteilen Chloroform mit 2 Volumteilen Alkohol 15 Minuten lang rührte, filtrierte und mit 1250 cm^3 des gleichen Gemisches nachspülte. Die Extraktion des Blattpulvers wird zunächst in gleicher Weise wiederholt und dann durch portionenweises Nachwaschen auf der Nutsche mit 1 Liter Alkohol und hierauf mit 4 Liter eines Gemisches von gleichen Teilen Alkohol und Wasser vervollständigt. So wird ein nahezu erschöpft extrahiertes Blattpulver bzw. Enzympräparat erhalten, das praktisch frei ist von Glucosiden, von Blattfarbstoffen, Phytosterinen, löslichen Kohlehydraten etc., also ein Material, das beim Enzymversuch an das Lösungsmittel gleicher Zusammensetzung, wie es für die Vorextraktion zuletzt verwendet wurde, nur noch so geringe Mengen von Stoffen abgibt, dass diese die Isolierung der enzymatisch gebildeten Glucoside nicht mehr zu stören vermögen.

b) Aus frischen Blättern. Zur enzymatischen Hydrolyse hat sich z. B. bei der Komponente C des Digilanids ein Enzympräparat aus frischen Blättern unter Verwendung eines Lösungsmittels geringerer Alkoholkonzentration als zweckmässig erwiesen. 3 kg frische Blätter von *Dig. lanata* wurden mittels einer Steinwalzenmühle zu einem feinen Brei zerrieben und hierauf mit 1560 cm^3 Alkohol versetzt, der mit dem Wasser des Blattbreis auf etwa 30% verdünnt wurde. Um die Vorextraktion zu begünstigen, fügten wir noch 3300 cm^3 30-proz. Alkohol hinzu und rührten eine Stunde lang

durch. Dann wurde filtriert, mit 1650 cm³ 30-proz. Alkohol nachgewaschen und der Rückstand nochmals 1½ Stunden lang mit 6600 cm³ 30-proz. Alkohol gerührt, wiederum abgenutscht, mit 1650 cm³ 30-proz. Alkohol nachgewaschen, scharf abgesaugt und sogleich für den Enzymversuch verwendet (siehe 4. Abschnitt).

2. *Acetyldigitoxin*.

a) Darstellung. Das zuletzt mit Alkohol-Wasser 1:1 vor-extrahierte Enzympräparat aus trockenen *Dig. lanata*-Blättern (siehe erster Abschnitt unter a) wird in eine Auflösung von 2 g Digilamid A in 1500 cm³ 50-proz. Alkohol eingetragen und die Suspension während 3 mal 24 Stunden bei Raumtemperatur (20—25°) gerührt, dann filtriert und mit 1500 cm³ 50-proz. Alkohol nachgewaschen. Der klare, grünlich braun gefärbte Extrakt wird nun 1 mal mit 600 cm³ und noch 2 mal mit je 300 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. Die abgetrennten vereinigten Chloroformlösungen werden mit 2 Liter Wasser gewaschen, worauf man zur Erleichterung der Schichten-trennung nach dem Schütteln zweckmässig 200 cm³ einer gesättigten Kochsalzlösung hinzufügt. Die wieder abgetrennte Chloroform-lösung schüttelten wir nochmals mit 1200 cm³ Wasser und 120 cm³ Kochsalzlösung aus und erhielten nach dem Einengen der getrockneten Chloroformlösung im Vakuum zur Trockne 1,9 g Rückstand.

Reinigung und fraktionierte Krystallisation des Röhproduktes. Trotz der Vorextraktion des Enzympräparates erwies sich eine Reinigung des erhaltenen Glucosides mit einem gerbstofffällenden Mittel vorteilhaft. Wir lösten die erhaltenen 1,9 g in 2 Liter Alkohol, versetzten die Lösung mit einer Aufschlammung von 20 g frisch dargestelltem alkalifreiem Bleihydroxyd und rührten die Suspension während einer Stunde. Dann wurde filtriert, nachgewaschen und das klare Filtrat durch Einengen im Vakuum auf etwa den 4. Teil des ursprünglichen Volumens vom Alkohol befreit. Durch Ausschütteln mit 300 cm³ und hierauf noch mit 150 cm³ Chloroform wird das zum Teil ausgeschiedene Glucosid aufgenommen und durch Eindampfen der Chloroformlösung im Vakuum in einer Ausbeute von 1,6 g gewonnen. Dieses rohe Acetyldigitoxin muss noch durch eine Reihe von Krystallisationen von gewissen Ballaststoffen, die mengenmässig zwar nicht beträchtlich sind, aber äusserst hartnäckig dem Glucoside anhaften, befreit werden.

Die in der theoretischen Übersicht erwähnte Bildung von wahrscheinlich zwei isomeren Glucosiden während der enzymatischen Spaltung erschwert die Isolierung von einheitlich krystallisierten Substanzen sehr, im besonderen bei den Komponenten A und B, etwas weniger bei Acetyldigoxin C. Wir haben daher vorerst sowohl in der A- wie in der B-Reihe nur je eine Modifikation, wahrscheinlich

die β -Formen der entglucosierten Acetylkörper isoliert, nämlich diejenigen, die unter unseren Versuchsbedingungen als Hauptmenge gewonnen wurden. Bei A verfahren wir wie folgt:

6,4 g, aus 4 Versuchen vereinigtes, rohes Acetyldigitoxin lösten sich in 64 cm³ Chloroform bis auf eine Trübung, die durch Filtration beseitigt wurde. Das durch Nachwaschen auf 70 cm³ gebrachte klare Filtrat wurde mit 800 cm³ trockenem Äther versetzt. Nach dem Kratzen an der Glaswand begann bald die Ausscheidung von krystallinischen Krusten, und man konnte nach 24 Stunden 4,3 g eines fast weissen krystallinischen Produktes abfiltrieren. Die Mutterlauge lieferte beim Eindampfen im Vakuum einen etwas fettigen Rückstand von 1,6 g, der beim Behandeln mit 25 cm³ Äther, wobei sich dieser gelb färbte, 1,2 g eines ebenfalls fast weissen Produktes zurückliess. Die beiden Fraktionen, 5,5 g, wurden zusammen in 330 cm³ warmem Methanol gelöst und noch warm mit 220 cm³ warmem Wasser versetzt. Nach dem Erkalten schieden sich rosettenförmig angeordnete Krystalle aus, die über Nacht den ganzen Kolbeninhalt durchsetzten. Die Ausbeute betrug an abfiltrierten Krystallen 4,3 g (I), also weitaus die Hauptmenge, während der kleinere Anteil von 1,2 g (II) in Lösung blieb und durch Eintrocknen derselben im Vakuum erhalten wurde. Die Teilung in die Fraktionen I und II bildet gleichzeitig eine rohe Trennung in die beiden oben erwähnten Isomeren. Wir beschreiben hier nur die Weiterverarbeitung der Hauptfraktion (I).

Die 4,3 g wurden wieder in 270 cm³ Methanol gelöst und die erwärmte Lösung mit 180 cm³ warmem Wasser verdünnt. Die oben beschriebene Krystallisation setzte alsbald ein und lieferte andern tags beim Abfiltrieren 3,9 g eines weissen Produktes. Zur weiteren Fraktionierung erwärmten wir die 3,9 g mit 200 cm³ Methanol auf dem Dampfbade. Bevor alle Substanz gelöst war, begann schon die Auskrystallisation eines zuerst in Lösung gegangenen Teiles in Form charakteristischer rautenförmiger Plättchen. Nach einer Stunde konnten 0,53 g dieser Krystalle durch Filtration gewonnen werden. Die Mutterlauge lieferte nach dem Einengen auf ca. 80 cm³ eine zweite Krystallisation in denselben typischen Formen und in einer Menge von 1,9 g. Das Filtrat wurde durch eine Zugabe von Methanol auf 180 cm³ gebracht und mit 120 cm³ warmem Wasser versetzt, worauf eine Krystallisation einsetzte, die beim Abfiltrieren noch 1,4 g eines weniger einheitlichen Glucosidpräparates lieferte. Wir lösten es in 50 cm³ heissem Methanol und erhielten nach dem Einengen der Lösung auf dem Dampfbad auf ca. 15 cm³ nochmals eine Krystallisation von grosser Reinheit in den typischen rautenförmigen Krystallen und in einer Ausbeute von 1,02 g.

Die 3 aus Methanol krystallisierten Fraktionen (0,53 g, 1,9 g und 1,02 g = 3,45 g) wurden zusammen in 40 cm³ Chloroform gelöst

und mit 200 cm³ Äther versetzt, worauf sogleich eine krystallinische Ausscheidung einsetzte, die aus kugeligen Gebilden mit strahliger Struktur bestand (Ausbeute 3,2 g). Dieses wenig ausgeprägte Krystallisationsvermögen in Chloroform-Äther ist charakteristisch für die vorliegende Form des Acetyldigitoxins, während die andere, isomere Form im Gegensatz dazu aus Chloroform-Äther in sehr schön ausgebildeten rechteckigen Blättchen zu krystallisieren scheint.

Die Wiederholung der Krystallisation mit den 3,2 g der kugeligen Gebilde aus Methanol ohne Wasserzusatz lieferte 2,74 g von den typischen rautenförmigen Krystallen in analysenreinem Zustand.

b) Eigenschaften. Wie bereits erwähnt, krystallisiert das Acetyldigitoxin (β) aus Methanol in kleinen glänzenden Rautenformen, die bei längerem Stehen zu ziemlich dicken Prismen auswachsen (Figur 1 der Tafel) und die im Exsikkator unter Verwittern ziemlich leicht Krystalllösungsmittel verlieren. Die Substanz ist äusserst schwer löslich in Äther, dagegen spielend löslich in Chloroform, etwa 10mal leichter als Digitoxin, nämlich 1 Teil in weniger als 10 Gew.-Teilen Chloroform, während Digitoxin nach unserer Beobachtung etwa 100 Gew.-Teile zur Lösung braucht. 1 Teil Acetyldigitoxin löst sich ferner in ca. 120 Teilen Methanol. Sehr charakteristisch ist die äusserste Schwerlöslichkeit in Wasser. Es ist darin noch bedeutend schwerer löslich als Digitoxin, das etwa 100 000 Teile Wasser zur Lösung braucht. Bringt man eine 1-promillige alkoholische Lösung von Acetyldigitoxin durch Wasserzusatz auf eine Verdünnung 1:100 000, so beginnt nach einiger Zeit die Ausscheidung. Erst in einer Verdünnung von 1:200 000 bleibt die Lösung längere Zeit klar. Auf dieser leichten Fällbarkeit durch Wasser aus relativ verdünnten alkoholischen oder methanolischen Lösungen beruht die Abtrennung von der isomeren Form, die durch Wasserzusatz viel weniger leicht ausgeschieden wird (siehe weiter oben). Für die therapeutische Verwendung wäre die Schwerlöslichkeit des vorliegenden Acetyldigitoxins in wässrigen Medien natürlich ungünstig.

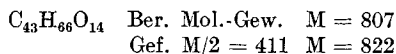
Acetyldigitoxin beginnt sich im Kapillarrohr bei ca. 200° (korr.) zu verfärben. Der Schmelzpunkt resp. Zersetzungspunkt liegt sehr unscharf zwischen 210 und 225° (korr.). Die *Keller-Kiliani*'sche Farbreaktion ist mit der von Digitoxin identisch.

Polarisation: 0,2399 g im Hochvakuum bei 100° getrocknete Substanz, gelöst zu 25 cm³ Pyridin ($c = 0,9596$) drehten bei 20° im 2 dm-Rohr um 0,32° nach rechts

$$[\alpha]_D^{20} = +16,7^{\circ}$$

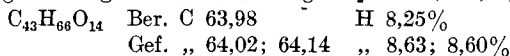
Bei der Lactontitration ist wie bei allen Acetylglucosiden darauf zu achten, dass auch die Acetylgruppe 1 Mol Lauge verbraucht; die cm³ NaOH sind daher für die Berechnung des Mol.-Gew. zu halbieren, oder das durch Titration gefundene Mol.-Gew. ist zu verdoppeln.

0,2036 g im Hochvakuum bei 100° getrocknete Substanz verbrauchten 4,95 cm³ 0,1-n. NaOH.



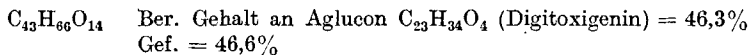
Elementaranalyse (Dr. Roth, Heidelberg): Bei 100° im Hochvakuum getrocknete Substanz.

4,258; 4,235 mg Subst. gaben 9,99; 9,96 mg CO₂ und 3,285; 3,255 mg H₂O.



c) Saure Hydrolyse des Acetyldigitoxins. 1,5 Acetyldigitoxin lösten wir in 82 cm³ Alkohol in der Wärme, kühlten die Lösung auf 40° ab und fügten im Laufe von 4 Stunden 75 cm³ einer wässrigen n. H₂SO₄ portionenweise hinzu. Die einzelnen Portionen wurden so bemessen, dass gerade keine Ausscheidung oder nur eine schwache Trübung entstand.

Zur Vervollständigung der Hydrolyse wurde der Ansatz noch 2 Stunden lang bei 40° gehalten, mit gleichviel Wasser von 40° versetzt und weitere 2 Stunden bei 40° stehen gelassen. Man liess dann langsam auf Zimmertemperatur abkühlen und über Nacht stehen, wobei sich zunächst nur ein einzelner Krystall in Form eines dünnen langen Spießes ausgeschieden hatte. Durch Umschwenken vermehrten sich die Krystallkeime und eine reichliche Krystallisation einheitlich aussehender, dünner, langer Prismen setzte ein, die, nach 24 Stunden abfiltriert (Agluconfraktion I) 0,46 g = $\frac{2}{3}$ der Theorie betrug. Die Mutterlauge wurde mit 200 cm³ Wasser verdünnt und daraus der Alkohol im Vakuum vertrieben bis auf ein Volumen von 300 cm³. Ein weiterer Teil des Aglucons hatte sich dabei ausgeschieden; wir nahmen es zusammen mit dem gelösten Anteil durch Ausschütteln mit 200 und mit 100 cm³ Chloroform auf und wuschen die Chloroformlösung 2mal mit je 50 cm³ Wasser, um mitgerissene Säure zu entfernen. Der nach dem Eindampfen im Vakuum zur Trockne erhaltene Rückstand wurde mit Methanol hochgezogen, im Vakuum bei 60° getrocknet und wog noch 0,24 g (II. Fraktion). Die Gesamtausbeute an Digitoxigenin belief sich somit auf 0,70 g oder 46,6% des angewandten Glucosids.



Die Agluconfraktion I (0,46 g) wurde aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert und zeigte dann den Schmelzpunkt von 245° (korr.). Das Präparat stimmte auch in der Farbreaktion, in den Löslichkeitsverhältnissen und Krystallisationseigenschaften mit Digitoxigenin überein. Beim Trocknen im Hochvakuum bei 100° verloren die Krystalle nicht an Gewicht.

Polarisation: 0,3577 g Substanz, gelöst zu 25 cm³ in Methanol ($c = 1,4308$) drehten bei 20° im 2 dm-Rohr um 0,51° nach rechts.

$[\alpha]_D^{20} = + 17,8^\circ$, in Übereinstimmung mit dem aus Digilanid A erhaltenen Digitoxigenin¹⁾.

d) Alkalische Hydrolyse des Acetyldigitoxins zum Digitoxin. Bei der alkalischen Abspaltung der Acetylgruppe aus den Digilaniden entstehen die relativ leichter löslichen Desacetyldigilanide, denen in Lösung ein starker Überschuss von Alkali schädlich wäre. Man muss sich daher bei der Alkalibehandlung der genuinen Glucoside auf ein Minimum des Alkalis beschränken. Die alkalische Hydrolyse des Acetyldigitoxins führt indessen zu dem äusserst schwer löslichen Digitoxin, das, kaum gebildet, sich durch Krystallisation der schädlichen Wirkung chemischer Reagentien entzieht. Statt der mild wirkenden Calciumhydroxyd-Lösung in geringem Überschuss wie bei den Digilaniden verwendeten wir für die Verseifung von Acetyldigitoxin einen grösseren Überschuss von 0,2-n. KOH, den wir einer methylalkoholischen Lösung des Acetyldigitoxins zusetzten.

0,5 g Acetyldigitoxin lösten wir in 50 cm³ Methanol, kühlten die Lösung auf etwa 12° ab und versetzten sie mit 50 cm³ einer wässrigen 0,2-n. KOH. Schon nach einer Minute begann die Krystallisation des acetylfreien Produktes in glänzenden Blättchen, die ganz an die Erscheinung beim Umkrystallisieren von Digitoxin aus verdünntem Alkohol erinnerte. Die Krystallisation wurde durch fortwährendes Kratzen mit einem Glasstab beschleunigt und war nach 10 Minuten vollständig. Wir neutralisierten nun die alkalische Flüssigkeit mit 0,1-n. HCl, wovon 93,0 cm³ nötig waren, was einem Laugenverbrauch von 7,0 cm³ 0,1-n. KOH bei der Acetylbspaltung entspricht, während die Theorie nur 6,0 cm³ 0,1-n. Lauge verlangt hätte. Wahrscheinlich hatte unter unseren Verseifungsbedingungen ein kleiner Teil des Glucosids Öffnung des Lactonrings erlitten.

Das ausgeschiedene Digitoxin wurde abfiltriert und in einer Menge von 0,4 g (80% der Theorie) als weisse Krystallmasse erhalten. Die Substanz wurde nach den Angaben *M. Cloetta's*²⁾ mehrmals umkrystallisiert, und zwar zweimal aus verdünntem Alkohol, einmal aus Chloroform-Äther und nochmals aus verdünntem Alkohol.

Die so erhaltene Substanz zeigte einen Schmelzpunkt von 252° (korr.) und erwies sich in der Farbreaktion, den Löslichkeits- und Krystallisationseigenschaften als identisch mit Digitoxin aus *Digitalis purpurea*.

Polarisation: 0,5184 g im Hochvakuum bei 95° getrocknete Substanz, gelöst in Dioxan zu 25 cm³ ($c = 2,0736$) drehten im 2 dm-Rohr bei 20° um 0,20° nach rechts.

$[\alpha]_D^{20} = + 4,8$ in Übereinstimmung mit aus *Digitalis purpurea* isoliertem und mit dem aus Desacetyldigilanid A gewonnenen Digitoxinpräparat³⁾.

¹⁾ Helv. **16**, 1091 (1933).

²⁾ Arch. exp. Path. Pharmacol. **88**, 119 (1920).

³⁾ Helv. **16**, 1399 (1933).

Elementaranalyse (Dr. Roth, Heidelberg): I. Bei 95° im Hochvakuum getrocknete Substanz:

4,470; 4,226 mg Subst. gaben 10,47; 9,87 mg CO₂ und 3,265; 3,140 mg H₂O

II. Bei 110° im Hochvakuum getrocknete Substanz:

4,300; 4,444 mg Subst. gaben 10,25; 10,59 mg CO₂ und 8,61; 8,56 mg H₂O

C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	Ber.	C 64,36	H 8,44%
	Gef. I. „	63,88; 63,70	„ 8,17; 8,32%
	II. „	65,01; 64,99	„ 8,61; 8,56%

3. Acetylgitoxin.

a) Darstellung. Das für die Abspaltung der Glucose aus Digilanid B verwandte Enzympräparat wurde aus 500 g Blattmehl von *Digitalis lanata* bereitet, wobei in gleicher Weise wie bei dem Abbau von Digilanid A vorextrahiert wurde. In einer Lösung von 2 g Digilanid B in 1500 cm³ 50-proz. Alkohol suspendierten wir das aus 500 g Droge gewonnene, scharf abgepresste Enzymmaterial und liessen es während 3 Tagen bei Raumtemperatur (20—25°) unter Umrühren einwirken. Nach dem Abnutschen und Nachwaschen mit im ganzen 3 L 50-proz. Alkohol schüttelten wir das Filtrat einmal mit 800 und noch zweimal mit je 400 cm³ Chloroform aus, verdampften die vereinigten Chloroformauszüge im Vakuum zur Trockne und erhielten 1,95 g Rückstand. Das rohe Glucosid wurde zur weiteren Reinigung in 2 L Alkohol gelöst und wie bei Acetyldigitoxin mit einer Suspension von 20 g Bleihydroxyd in 2 L Wasser versetzt. Nach dem Abfiltrieren des Bleiniederschlages schüttelten wir die alkoholisch-wässrige Lösung einmal mit 800 und noch zweimal mit je 400 cm³ Chloroform aus und verdampften die vereinigten Chloroformauszüge im Vakuum zur Trockne (1,6 g).

Der Trockenrückstand wurde unter Zugabe von 1,6 cm³ Methanol in 50 cm³ Chloroform aufgelöst und die Lösung mit 150 cm³ Äther versetzt. Anderntags konnte von einer krystallinischen Ausscheidung abfiltriert werden. Beim Eindampfen des Filtrats im Vakuum zur Trockne hinterblieb ein gelblicher öligler Rückstand, aus dem sich beim Behandeln mit 50 cm³ Äther eine feste Substanz ausschied, die abfiltriert und mit der ersten Ausscheidung vereinigt wurde. Wir erhielten so 1,36 g eines vorgereinigten Glucosidpräparates, das nun in 80 cm³ Methanol aufgelöst und mit 8 cm³ Wasser versetzt wurde. Die Lösung kochten und entfärbten wir mit 0,1 g Tierkohle und versetzten sie nach dem Erkalten und Filtrieren mit 45 cm³ Wasser. Nach und nach schieden sich Krystallbüschel aus, die, nach einer Stunde abfiltriert, 0,35 g wogen. Der aus der Mutterlauge durch Eindampfen im Vakuum erhaltene Trockenrückstand (1 g) wurde in einer Mischung von 20 cm³ Chloroform und 10 cm³ Methanol aufgelöst und die Lösung mit 120 cm³ Äther versetzt. Die dabei auftretende flockige Trübung filtrierte man ab und verdünnte das Filtrat mit weiteren 30 cm³ Äther, ohne dass nun Trübung auf-

trat. Nach eintägigem Stehen hatte sich eine nicht einheitlich erscheinende Krystallisation (0,7 g) gebildet. Eine gleiche Umkrystallisation dieser Substanz aus Chloroform-Methanol-Äther verbesserte die Einheitlichkeit der Krystallformen nicht. Wir vereinigten das abfiltrierte Produkt, 0,3 g, mit dem weiter oben gewonnenen krystallisierten Präparat (0,35 g) und lösten in 65 cm³ Methanol. Von einem geringen ungelösten Rückstand wurde abfiltriert und das Filtrat mit 44 cm³ Wasser versetzt. Nur langsam begann die Krystallisation des Glucosids in gleichmässigen, feinen, verfilzten Nadelchen. Nach 2 Tagen wurden 0,40 g abfiltriert. Man wiederholte damit gleicherweise die Umkrystallisation aus Methanol-Wasser und beobachtete dieselbe langsame Ausscheidung der feinen verfilzten Nadelchen von Acetylgitoxin (0,25 g). Einer gewissen Trägheit dieser Substanz in der Krystallisation und der Beimengung des optisch isomeren Acetylgitoxins, das bisher noch nicht rein dargestellt wurde, ist es wohl zuzuschreiben, dass die Ausbeute an einheitlichem Präparat, wie es im folgenden beschrieben wird, nicht besser ist.

b) Eigenschaften. Acetylgitoxin (β) krystallisiert aus Methanol-Wasser, wie erwähnt, in feinen Nadelchen, bzw. langen, dünnen Prismen (Fig. 2 der Tafel). 1 Teil des Präparates löst sich in 80—100 Teilen Methanol; in Wasser und in Äther ist es sehr schwer löslich. Im Kapillarrohr erhitzt, beginnt es sich oberhalb 200° zu verfärben und schmilzt unter Zersetzung bei 220—225° (korr.).

Bei der *Keller-Kiliani*'schen Farbreaktion verhält es sich qualitativ wie Digilanid B, jedoch treten die Farbzonen, sowohl die obere blaue, wie auch die untere, rote, viel intensiver in Erscheinung. Von der Farbreaktion des Gitoxins ist sie kaum zu unterscheiden.

Polarisation: 0,1921 g Subst. gelöst zu 15 cm³ Pyridin ($c = 1,28$) drehten bei 20° im 2 dm-Rohr um 0,40° nach rechts.

$$[\alpha]_D^{20} = + 15,7^{\circ}$$

Elementaranalyse (Dr. *Roth*, Heidelberg): Subst. bei 95° im Hochvakuum über P₂O₅ getrocknet

4,334; 4,455 mg Subst. gaben 10,00; 10,275 mg CO₂ und 3,190; 3,245 mg H₂O.

C ₄₃ H ₆₆ O ₁₅	Ber. C 62,74	H 8,09%
	Gef. „ 62,93; 62,90	„ 8,05; 7,97%

c) Alkalische Hydrolyse des Acetylgitoxins (β) zu Gitoxin. 0,20 g Acetylgitoxin wurden in 25 cm³ Methanol gelöst und unter Umschwenken allmählich mit 25 cm³ wässriger 0,2-n. KOH versetzt. Schon nach 10 bis 20 Sekunden begann die Krystallisation des acetylfreien Produktes in ganz kleinen Plättchen. Nach 10 Minuten wurde neutralisiert und filtriert (0,16 g). Die erhaltene Substanz zeigte die für Gitoxin charakteristische Schwerlöslichkeit in Alkoholen und nach der Reinigung durch Digerieren mit Alkohol-Pyridin-Gemisch, Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol und Chloroform-Methanol-Äther den hohen Schmelzpunkt von 280° (korr.).

Polarisation: 0,1332 g Substanz, gelöst in 14,8 cm³ Pyridin ($c = 0,896$) drehen beim Licht der D-Linie um 0,053° (Mittelwert aus 5 Ablesungen) und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 5461 \text{ m}\mu$ um 0,063 (Mittelwert aus 5 Ablesungen) nach rechts.

$$[\alpha]_D^{20} = + 2,96^\circ \quad [\alpha]_{5461}^{20} = + 3,52^\circ.$$

Smith¹⁾ fand für Gitoxin $[\alpha]_{5461}^{20} = + 3,5^\circ$.

Für das aus Desacetyldigilanid B durch enzymatischen Abbau erhaltene Gitoxin hatten wir gefunden²⁾:

$$[\alpha]_{5461}^{20} = + 3,54^\circ$$

Elementaranalyse (Dr. Roth, Heidelberg): Subst. bei 95° im Hochvakuum über P₂O₅ getrocknet.

4,319; 4,170 mg Subst. gaben 9,90; 9,57 mg CO₂ und 3,260; 3,160 mg H₂O

C₄₁H₆₄O₁₄ Ber. C 63,05 H 8,26%
Gef. „ 62,52; 62,59 „ 8,45; 8,48%

Verschiedene, bei der Darstellung des vorstehend beschriebenen, schön krystallisierten Acetylgitoxins (β) aus den Krystallisationsmutterlaugen gewonnene Glucosidpräparate, die weniger gut und nicht einheitlich krystallisierten, lieferten bei der alkalischen Hydrolyse reines Gitoxin in guter Ausbeute. Die unversehrte Gitoxinmolekel ist also auch dem isomeren Produkt eigen.

4. Acetyldigoxin α und β .

a) Darstellung des isomeren Gemisches ($\alpha + \beta$). Als Enzympräparat für die Abspaltung der Glucose aus Digilanid C verwendeten wir ein aus lebenden Blättern der Dig. lanata frisch bereitetes und mit 30-proz. Alkohol vorextrahiertes Material und liessen die enzymatische Reaktion statt in 50-proz. Alkohol und bei 20—25°, wie bei den Komponenten A und B, bei Digilanid C in 30-proz. Alkohol und wenigstens zeitweise bei 35° ablaufen.

Ein aus 3 kg frischen Dig. lanata-Blättern gewonnenes Enzympräparat (s. Abschnitt 1, b) wurde in noch feuchtem Zustand in eine Lösung von 6,7 g Digilanid C in 6,6 L 30-proz. Alkohol eingetragen. Man rührte die Suspension während 3½ Tagen und hielt sie tagsüber bei 35°, während sie sich nachts auf Zimmertemperatur abkühlte. Nach dem Abnutschen wurde noch mit 2½ L 30-proz. Alkohol portionenweise nachgewaschen und das Filtrat mit 2,1 L Alkohol vermischt, um den Übergang des Glucosids in Chloroform bei darauffolgendem Ausschütteln zu erleichtern. Portionen von je 3 L der Lösung wurden mit 600 cm³ und hierauf noch mit 300 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. So erhielt man etwa 9 L der vereinigten Chloroformlösungen, die nun mit 3 L Wasser durchgeschüttelt wurden. Entstandene Emulsionen brachte man durch Alkoholzusatz zum Verschwinden. Das Waschwasser wurde nochmals mit Chloroform ausgeschüttelt, wobei abermals ein Alkoholzusatz zur Erleichterung der Schichtentrennung notwendig war. Die alkoholhaltigen Chloro-

¹⁾ Soc. 1931, 23.

²⁾ Helv. 16, 1403 (1933).

formlösungen verdampften wir nun im Vakuum bei niedrigerer Temperatur zur Trockne, lösten den grünlich gefärbten Rückstand in 3600 cm³ Alkohol und rührten die Lösung zusammen mit einer feinen Aufschlämmung von 60 g frisch dargestelltem alkalifreiem Bleihydroxyd in 3600 cm³ Wasser 1 Stunde lang, filtrierten und schüttelten das klare Filtrat mit 1500 cm³ und dann noch mit 750 cm³ Chloroform aus. Die vereinigten Chloroformauszüge dampften wir im Vakuum zur Trockne, verrieben den Rückstand mit 250 cm³ Äther zu feiner Suspension, erwärmten bis zum Sieden des Äthers und filtrierten 5,15 g des schon ziemlich reinen Gemisches der beiden Acetyldigoxine α und β ab; der Ätheranteil wurde verworfen.

b) Trennung der beiden Acetyldigoxine α und β . Von den beiden Isomeren zeigt das eine (α) eine auffallende Schwerlöslichkeit in den Alkoholen und eine sehr gute Krystallisierbarkeit sowohl aus Chloroform-Methanol-Äthergemischen wie aus verdünnten Alkoholen. Wir verwendeten nach weniger erfolgreichen Vorversuchen in anderer Richtung hauptsächlich diese ausgeprägten Eigenschaften des Acetyldigoxins α , um es von der β -Form, die leichter löslich ist und aus Methanol-Chloroform-Äther weniger leicht krystallisiert, abzutrennen.

Die 5,15 g des vorgereinigten Gemisches von Acetyldigoxin α und β (siehe vorstehender Abschnitt) behandelten wir zunächst mit 50 cm³ heissem Methylalkohol, wobei ein Teil ungelöst blieb, liessen einige Zeit stehen und filtrierten 1,15 g eines weissen Pulvers ab. Das Filtrat versetzten wir mit 100 cm³ Äther, worauf zuerst eine Trübung und dann reichlich Krystallisation eintrat. Nach 20 Stunden konnten 2,2 g Substanz abfiltriert werden, die mit dem in Methanol ungelöst gebliebenen Anteil (1,15 g) zur Hauptfraktion I vereinigt wurden (3,35 g) und welche die α -Form angereichert enthält. Die ätherisch-methanolische Mutterlauge mit vorwiegend dem β -Isomeren lieferte beim Einengen im Vakuum bei niedriger Temperatur 1,8 g Rückstand (Hauptfraktion II). Natürlich stellt diese erste Aufteilung des Gemisches in die beiden Hauptfraktionen I und II erst eine rohe Trennung der beiden isomeren Formen des Acetyldigoxins dar.

Die α -reiche Fraktion I (3,35 g) lösten wir in einem Gemisch von 50 cm³ Chloroform und 50 cm³ Methanol auf und fügten, ohne von einer leichten Trübung abzufiltrieren, 300 cm³ Äther hinzu. Nach zweitägigem Stehen konnten 3,05 g eines krystallinischen Präparates abfiltriert werden. Wir nahmen diese Substanz mit einem warmen Gemische von 200 cm³ Alkohol und 40 cm³ Wasser auf, kochten die noch leicht gefärbte Lösung unter Zusatz von 0,15 g Entfärbungskohle dreimal auf, kühlten etwas ab und filtrierten durch eine dünne Talkschiicht. Das klare, nun farblose Filtrat ver-

dünnten wir mit 260 cm³ Wasser und liessen über Nacht stehen. Anderntags hatten sich neben der Hauptmenge des Glucosids in schön ausgebildeten, grossen prismatischen Einzelkrystallen (α -Form) ganz feine Haarbüschel der β -Form ausgeschieden. Wir hatten offenbar zuviel Wasser zugesetzt; die Trennung der Isomeren war in diesem Krystallisationsversuch nicht gefördert worden.

Das aus Alkohol-Wasser ausgeschiedene Glucosidgemisch (1,12 g) wurde mit einer weiteren Ausscheidung, die nach dem Eindampfen des Filtrates im Vakuum auf die Hälfte und einstündigem Stehen erhalten worden war (1,36 g), vereinigt, fein gepulvert und mit 50 cm³ Methanol bis zum Sieden erhitzt, wobei ein erheblicher Teil ungelöst blieb. Nach dem Erkalten konnten 0,74 g abfiltriert werden. Aus dem auf 15 cm³ im Vakuum eingeeengten Filtrat schieden sich bald 1,04 g kleine Krystalle aus. Dieses Produkt stellt Acetyldigoxin α von grosser Reinheit dar. Es konnte durch Auflösen in einem Gemisch von 20 cm³ Chloroform und 20 cm³ Methanol und Zugabe von 100 cm³ Äther in ganz einheitlichen, rechteckigen Blättchen erhalten werden (1,0 g). Die β -Form des Acetyldigoxins ist in diesem Lösungsmittelgemisch so leicht löslich, dass sie daraus nicht auskrystallisiert.

Die in Methanol ungelöst gebliebene Fraktion (0,74 g) von Acetyldigoxin α war mit einer hartnäckig anhaftenden, schwerlöslichen, nicht glucosidischen Substanz verunreinigt, die aus dem Enzympräparat stammen musste, und die durch Auflösen des Präparates in einem Gemisch von gleichen Vol.-Teilen Chloroform und Methanol und Zufügen von Äther beseitigt werden konnte. Hierbei scheidet sich zuerst die schwerlösliche Verunreinigung in Form einer Trübung aus. Die durch Filtration geklärte Lösung scheidet das Glucosid in Kryställchen aus. Diese Operation wird so oft wiederholt, bis bei der Ätherzugabe keine Trübung mehr auftritt. So kann auch aus dieser Fraktion reines Acetyldigoxin α gewonnen werden. Die Ausbeute an α -Glucosid kann durch Aufarbeiten der verschiedenen Mutterlaugenpräparate noch erhöht werden, wenn die bereits beschriebenen Methoden sinngemäss zur Anwendung gelangen.

Die Hauptfraktion II (1,8 g) löste sich in 20 cm³ Methanol beim Erwärmen nicht klar auf. Wir filtrierten von der Trübung ab und versetzten das Filtrat mit 4 cm³ Wasser. Beim Abkühlen krystallisierten feine verfilzte Nadelchen aus, die den ganzen Inhalt des Gefässes durchsetzten und einen zusammenhängenden Krystallkuchen bildeten. Das abfiltrierte Präparat (0,6 g) war in Methanol spielend löslich, sodass es in 3 cm³ Methanol glatt in Lösung ging. Diese Lösung blieb beim Versetzen mit 15 cm³ Äther im Gegensatz zur α -Form klar. Erst beim Eindunsten auf ein kleines Volumen bildeten sich Bündel von nadelförmigen Krystallen (0,3 g), die ab-

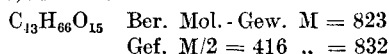
filtriert und in 6 cm³ Methanol gelöst wurden. Die Zugabe von nur 0,6 cm³ Wasser bewirkte eine dicke Ausscheidung, die durch Erwärmen wieder in Lösung gebracht wurde. Bei langsamem Abkühlen und Stehenlassen über Nacht hatte sich ein Teil des nun reinen Acetyldigoxins β in sehr dünnen, langen Prismen ausgeschieden und wurde abfiltriert. Aus der Mutterlauge konnte durch weitere Zugabe von wenig Wasser noch eine weitere einheitliche Krystallisation gewonnen werden. Auf dem Filter erscheinen die Krystalle von Acetyldigoxin β rein weiss und seidenglänzend. Bei weiterem Umkrystallisieren aus Methanol-Wasser erfuhren sie keine Veränderung ihrer Eigenschaften. Aus den Mutterlauge konnten unter Verwendung der beschriebenen Methoden weitere Mengen des reinen Acetyldigoxins β erhalten werden.

c) Eigenschaften und Analyse des Acetyldigoxins α . Aus einem Gemisch von Chloroform-Methanol 1:1 krystallisiert die Substanz nach Ätherzusatz in schön ausgebildeten, quadratischen bis rechteckigen, dünnen, glänzenden Blättchen (Fig. 3 der Tafel), die beim Stehen an der Luft nicht verwittern. Aus verdünntem Alkohol krystallisiert Acetyldigoxin α in schönen flachen Prismen aus. Die getrocknete Substanz beginnt beim Erhitzen im Kapillarrohr bei 222° weich zu werden und schmilzt unter Zersetzung bei 230° (korr.). 1 Teil Acetyldigoxin α braucht zur Lösung bei gewöhnlicher Temperatur etwa 80 Teile Methanol und etwa 650 Teile Äthanol; in Chloroform ist es bedeutend schwerer löslich als Acetyldigitoxin.

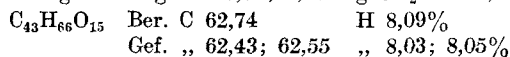
Polarisation: 0,2369 g im Hochvakuum bei 100° getrocknete Substanz, gelöst zu 25 cm³ Pyridin ($c = 0,9476$) drehten bei 20° im 2 dm-Rohr um 0,34° nach rechts.

$$[\alpha]_D^{20} = +18,0^{\circ}$$

Lactontitration: 0,1836 g im Hochvakuum bei 100° getrocknete Substanz verbrauchten 4,41 cm³ 0,1-n. NaOH



Elementaranalyse (Dr. Roth, Heidelberg): Bei 100° im Hochvakuum getrocknete Substanz 4,347; 4,142 mg Subst. gaben 9,95; 9,50 mg CO₂ und 3,12; 2,98 mg H₂O.



d) Eigenschaften und Analyse des Acetyldigoxins β . Aus konzentrierter methylalkoholischer Lösung wird die Substanz beim Zusatz von 10 bis 20% Wasser in feinen, langen seidenglänzenden Prismen (Fig. 4) ausgeschieden und ist in dieser Krystallmodifikation in Methanol und Äthanol spielend löslich. Es scheint noch eine andere Modifikation von Acetyldigoxin β zu bestehen, die in Methanol und Äthanol schwerer löslich ist und die erhalten wurde, als man eine Pyridinlösung, die zur Bestimmung des optischen Drehvermögens gedient hatte, im Vakuum bei niedriger Temperatur eindampfte

und den erhaltenen Rückstand zur Befreiung von Pyridinresten mit trockenem Äther behandelte. Die so erhaltene Form brauchte zur Lösung etwa 40 Teile Methanol und 120 Teile Äthanol. Nach Wasserzusatz zu solchen alkoholischen Lösungen wurden wieder die in Methanol und Äthanol spielend leicht löslichen Krystalle erhalten. In Chloroform löst sich Acetyldigoxin β schwer auf und äusserst schwer in Äther und Wasser.

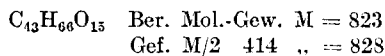
Beim Erhitzen der aus Methanol-Wasser krystallisierten Substanz im Kapillarrohr tritt bei ca. 170° ein teilweises Schmelzen ein (Abgabe von Krystalllösungsmittel?). Die Substanz erstarrt bei weiterer Temperatursteigerung wieder und schmilzt schliesslich bei 258° (korr.) unter Zersetzung.

Bei der *Keller-Kilian'schen* Farbreaktion verhält sich Acetyldigoxin β wie die α -Form und auch wie Digoxin: Tiefblaue Zone in Eisessig, braune Zone in der Schwefelsäure.

Polarisation: 0,1930 g im Hochvakuum getrocknete Substanz, gelöst zu 25 cm^3 Pyridin ($c = 0,772$) drehten im 2 dm-Rohr bei 20° um $0,45^{\circ}$ nach rechts.

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

Lactontitration: 0,1760 g im Hochvakuum bei 100° getrocknete Substanz verbrauchten $4,25 \text{ cm}^3$ 0,1-n. NaOH.



Elementaranalyse (Dr. *Roth*, Heidelberg): Bei 100° im Hochvakuum getrocknete Substanz.

- I. 4,206; 3,992 mg Subst. gaben 9,60; 9,11 mg CO_2 und 2,90; 2,81 mg H_2O .
 II. 3,724; 3,854 mg Subst. gaben 8,49; 8,82 mg CO_2 und 2,66; 2,765 mg H_2O .

$\text{C}_{43}\text{H}_{66}\text{O}_{15}$	Ber. C 62,74	H 8,09%
	Gef. I. ,, 62,25; 62,24	„ 7,72; 7,88%
	II. ,, 62,18; 62,41	„ 7,99; 8,01%

e) Alkalische Hydrolyse des Acetyldigoxins α zu Digoxin. Die Bedingungen zur Abspaltung der Acetylgruppe waren die gleichen wie bei der Entacetylierung von Acetyldigitoxin und Acetylgitoxin. 0,6 g Acetyldigoxin α wurden in 20 cm^3 warmem Methylalkohol aufgelöst. Der auf etwa 12° abgekühlten Lösung fügten wir 20 cm^3 einer wässrigen 0,2-n. KOH hinzu, worauf schon nach wenigen Minuten die Krystallisation des acetylfreien Produkts begann. Durch Kratzen mit einem Glasstab beschleunigten wir die Ausscheidung und neutralisierten nach im ganzen 10 Minuten langer Alkalieinwirkung mit 0,1-n. HCl. Die ausgeschiedenen Krystalle wurden abfiltriert (0,44 g) und zweimal aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, worauf das Präparat in der Farbreaktion, dem Schmelzpunkt und in den Löslichkeits- und Krystallisationseigenschaften mit Digoxin übereinstimmte. Die lufttrockene Substanz zeigte im Hochvakuum bei 100° keine Gewichtsabnahme.

Polarisation: 0,1975 g Substanz, gelöst zu 25 cm³ in Pyridin ($c = 1,580$) drehten bei 20° im 2 dm-Rohr bei einer Wellenlänge von $\lambda = 5461 \text{ m}\mu$ um 0,41°, beim Lichte der D-Linie um 0,33° nach rechts.

$$[\alpha]_{5461}^{20} = + 13,0^{\circ} \quad [\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 10,4^{\circ}$$

in Übereinstimmung mit dem von *Smith*¹⁾ beschriebenen und dem von uns²⁾ aus Desacetyldigilanid C erhaltenen Digoxin.

Elementaranalyse (Dr. E. Wiedemann, Basel): 3,695 mg Subst. gaben 8,540 mg CO₂ und 2,758 mg H₂O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{41}\text{H}_{61}\text{O}_{14} \quad \text{Ber. C } 63,05 \quad \text{H } 8,26\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{„ } 63,03 \quad \quad \text{„ } 8,33\% \end{array}$$

f) Alkalische Hydrolyse von Acetyldigoxin β zu Digoxin. Eine auf 12° gekühlte Lösung von 0,5 g Acetyldigoxin β in 20 cm³ Methylalkohol wurde mit 20 cm³ wässriger 0,2-n. KOH versetzt. Schon nach 2 Minuten begann die Krystallisation der acetylfreien Substanz, die in genau gleicher Weise wie bei der Entacetylierung von Acetyldigoxin- α aufgearbeitet wurde.

Die so gewonnene Reinsubstanz war in allen Eigenschaften identisch sowohl mit dem aus Desacetyldigilanid C durch enzymatische Glucoseabspaltung als auch mit dem aus Acetyldigoxin α durch Entacetylierung gewonnenen Digoxin.

Als schärfstes Kriterium für den Vergleich diente die Bestimmung des optischen Drehvermögens³⁾.

Polarisation: 0,2340 g Subst., gelöst zu 15,1 cm³ Pyridin ($c = 1,55$) drehten bei 20° im 2 dm-Rohr das Licht der D-Linie um 0,33°, Licht von $\lambda = 5461 \text{ m}\mu$ um 0,41° nach rechts.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 10,7^{\circ} \quad [\alpha]_{5461}^{20} = + 13,25^{\circ}$$

Aus beiden optischen Isomeren des Acetyldigoxins war somit bei der Abspaltung der Acetylgruppe unter kurzdauernder Alkaliwirkung identisches Digoxin erhalten worden.

Basel, Wissenschaftliches Laboratorium der Chemischen Fabrik
vorm. *Sandoz*.

¹⁾ Soc. 1930, 508.

²⁾ z. B. Helv. 16, 1407 (1933).

³⁾ Vgl. auch vorigen Abschnitt e).