

CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

89. Jahrg. Nr. 6

S. 1353 – 1592

197. Erich Haaek, Fritz Kaiser und Helmut Spingler:
Über Gitaloxin, ein neues Hauptglykosid aus den Blättern von
Digitalis purpurea^{*})

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

(Eingegangen am 14. Februar 1956)

Aus Extrakten von *Digitalis purpurea* („Gitalin-Fraktion“) konnte durch mehrfache Säulenchromatographie des Glykosidgemisches das neue Glykosid Gitaloxin rein gewonnen werden. Gitaloxin erwies sich als 16-Formyl-gitoxin und damit als das erste in der Natur aufgefundene, mit Ameisensäure veresterte Herzglykosid. Das Aglykon des Gitaloxins, Gitaloxigenin, wurde ebenfalls durch Verteilungschromatographie aus der „Gitalin-Fraktion“ isoliert. Es werden Angaben über Gitaloxin-Gehalte von *Digitalis-purpurea*-Drogen verschiedener Herkunft gemacht.

In der älteren und neueren *Digitalis*-Literatur findet man immer wieder Hinweise, daß sich in Extrakten aus fermentierten Blättern der *Digitalis purpurea* außer Digitoxin und Gitoxin eine dritte Substanz befinden muß, die hochwirksam und allem Anschein nach unter gewissen Umständen instabil ist.

Schon im Jahre 1912 stellte F. Kraft¹⁾ aus einem mit Chloroform ausgezogenen Kaltwasser-Blätterextrakt eine Fraktion her, die er für einheitlich hielt und Gitalin nannte. Kurze Zeit später wies aber H. Kiliani²⁾ nach, daß dieses Gitalin ein Gemenge ist, ohne jedoch genaue Angaben über die Zusammensetzung machen zu können. Er isolierte Anhydrogitalin (=Gitoxin) und wahrscheinlich Digitoxin und schlug vor, die Bezeichnung Gitalin aus der Literatur zu streichen. M. Cloetta und E. Brauchli³⁾ nannten im Jahre 1926 ein von ihnen isoliertes Glykosid erneut Gitalin, dem A. Windaus⁴⁾ die Zusammensetzung Gitoxigenin-hydrat + 2 Digitoxose zuschrieb. Die Darstellung dieses Glykosids ist aber bisher nicht wieder gelungen⁵⁾.

Zu einem vorläufigen Abschluß kam die Aufklärung der Hauptglykoside der *Digitalis purpurea* durch die grundlegende Arbeit von A. Stoll und W. Kreis⁶⁾, worin die genuinen Purpureaglykoside A und B beschrieben wurden, aus denen erst durch fermentative Abspaltung von Glucose die Sekundärglykoside Digitoxin und Gitoxin entstehen. Ein Gitalin, oder dessen Primärglykosid, haben Stoll und Kreis nicht gefunden. In neuester Zeit stellte aber M. Ishidate⁷⁾ wieder fest, daß in der wasserlöslichen Fraktion der Blätter ein sehr unbeständiges Gitoxigeninderivat enthalten ist.

Im Verlauf unserer chromatographischen Untersuchungen der Extrakte aus *Digitalis*-Blättern verschiedener Herkunft⁸⁾ und besonders der aus diesen

^{*}) Vorläufige Mitteil.: *Naturwissenschaften* **42**, 441 [1955].

¹⁾ Arch. Pharmaz. **250**, 120 [1912]. ²⁾ Arch. Pharmaz. **252**, 13 [1914].

³⁾ Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **112**, 261 [1926].

⁴⁾ Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **135**, 253 [1928].

⁵⁾ Vergl. z. B. W. A. Jacobs u. E. L. Gustus, *J. biol. Chemistry* **79**, 553 [1928].

⁶⁾ Helv. chim. Acta **18**, 120 [1935]. ⁷⁾ Pharmazie **9**, 589 [1954].

⁸⁾ E. Haaek, F. Kaiser, M. Gube u. H. Spingler, *Arzneimittel-Forsch.* **6**, 176 [1956].

Blattproben hergestellten „Gitalin-Fractionen“ (wir benutzten das Handelsprodukt „Verodigen“**) sahen wir auf mit Xylol-Methyläthylketon 1:1 entwickelten Formamid-Chromatogrammen⁹⁾ eine neue Substanz mit dem R_F -Wert 0.55, die offenbar in beträchtlicher Konzentration anwesend war. Nach Elution der Flecken aus dem Chromatogramm, alkalischer Behandlung und erneuter Papierchromatographie war die Substanz nunmehr nach R_F -Wert und sonstigen Eigenschaften nicht vom Gitoxin zu unterscheiden. Ebenso verhalten sich die bekannten beiden Acetylgitoxine aus *Digitalis lanata*, deren R_F -Werte aber, wenn auch sehr ähnlich, doch nicht mit dem R_F -Wert der neuen Substanz identisch waren. Wir vermuteten daher in der neuen Substanz ein bisher noch unbekanntes Acylgitoxin, dem wir den Namen „Gitaloxin“ gaben.

Neben diesem Glykosid sahen wir fernerhin einen neuen Stoff, der den gleichen R_F -Wert wie Digitoxin besaß, aber im Gegensatz dazu eine blaue Fluorescenz hatte. Elution, Alkali-Behandlung und erneute Papierchromatographie des gemeinsamen Fleckens ergab nunmehr einerseits Digitoxin ohne den blau fluoreszierenden Körper und andererseits Gitoxigenin. Es mußte sich damit bei dieser neuen Substanz um ein Acylgitoxigenin handeln, in dem wir das Gitaloxigenin, das Genin des neuen Glykosids, vermuteten.

Die besondere Bedeutung des neuen Acylgitoxins ergab sich aus der Beobachtung, daß die am Meerschweinchen gemessene Herzwirksamkeit von Purpurea-Extrakten in eindeutigen Zusammenhang mit dem Gehalt an diesem Cardenolid stand⁸⁾.

Isolierung des Gitaloxins

Die Versuche zur Isolierung des neuen Glykosids aus der „Gitalin-Fraktion“ nach den in der Chemie der Herzgifte üblichen Methoden führten nicht zum Ziel. Auch das häufig benutzte Verfahren der Chromatographie an Aluminiumoxyd brachte kein Ergebnis, weil das Acylgitoxin an der Säule entacyliert wurde. Die Isolierung gelang uns jedoch durch verteilungschromatographische Vortrennung des Verodigens an mit Formamid imprägnierten Cellulosepulversäulen mit dem Lösungsmittelsystem Xylol-Methyläthylketon 1:1 und anschließender Auftrennung des dabei erhaltenen einfacheren Glykosidgemisches mit dem System Cyclohexan-Tetrahydrofuran 1:1.

Die das Gitaloxin enthaltende Fraktion wurde nach Eindampfen aus Aceton und Petroläther umkristallisiert und ergab die neue Verbindung in chromatographisch reiner Form. Das Gitaloxin schmilzt bei 250–253° und ist auf Grund von Schmelzpunkt, Drehung und Löslichkeit tatsächlich von den bekannten Acetylgitoxinen aus *Digitalis lanata* verschieden. Der Acylrest wird in saurer oder alkalischer Lösung außerordentlich leicht abgespalten. Sogar in alkoholischer, wäßrig-alkoholischer und selbst in chloroform-alkoholischer Lösung tritt diese Abspaltung mehr oder weniger schnell ein. Auf dieser Tatsache beruht vermutlich zum großen Teil die seit langem bekannte Wirksamkeitsabnahme von flüssigen Digitalis-Zubereitungen.

**) Wz. der Fa. C. F. Boehringer & Soehne, G. m. b. H., Mannheim-Waldhof.

⁹⁾ F. Kaiser, Chem. Ber. 88, 556 [1955].

Isolierung des Aglykons (Gitaloxigenin)

Zur Aufklärung der Konstitution des Gitaloxins haben wir die Verbindung durch Abspaltung des Zuckerrestes zum Gitaloxigenin abgebaut. Unter den üblichen Hydrolysebedingungen in saurer Lösung entstand jedoch immer nur Gitoxigenin, weil gleichzeitig auch die Acylgruppe abgespalten wurde. Wir haben daraufhin die verschiedensten sauren Verseifungsbedingungen unter ständiger papierchromatographischer Kontrolle des Reaktionsverlaufs untersucht. Die Proben wurden dazu in Abständen von je 5 Min. entnommen. Am günstigsten verlief die Hydrolyse mit 0.1 *n* HCl in Aceton-Lösung. Dabei entstand neben Gitoxigenin und wenig Gitoxin das gesuchte Aglykon Gitaloxigenin, das nach chromatographischer Trennung an Formamid-Cellulose-Säulen mit Heptan-Chloroform 1:1 und Kristallisation aus Aceton-Petroläther einheitlich war. Es erwies sich nach Schmelzpunkt und Misch-Schmelzpunkt als identisch mit der oben erwähnten als Gitaloxigenin vermuteten Substanz aus der „Gitalin-Fraktion“, die bei der Papierchromatographie einen mit dem Digitoxin identischen R_F -Wert zeigte. Damit war erwiesen, daß das Gitaloxin die Acylgruppe im Aglykon und nicht im Zuckerrest enthält.

Wir haben zunächst für Gitaloxin und Gitaloxigenin den Zusammenhang mit Gitoxin und Gitoxigenin bewiesen. Das aus Gitaloxin bei milder Einwirkung von Alkali entstehende „Gitoxin“ ist sowohl papierchromatographisch wie durch Misch-Schmelzpunkt von authentischem Gitoxin nicht zu unterscheiden. Das aus Gitaloxin bei üblicher saurer Hydrolyse oder aus isoliertem Gitaloxigenin durch milde alkalische Verseifung entstehende „Gitoxigenin“ erweist sich durch R_F -Wert und durch Schmelzpunkt und Misch-Schmelzpunkt ebenfalls als identisch mit authentischem Gitoxigenin. Darüber hinaus ergibt auch die Acetylierung dieses aus Gitaloxigenin entstandenen Gitoxigenins mit Acetanhydrid in Pyridin^{10,11}) das gleiche Gemisch von viel 16-Acetyl-gitoxigenin (Oleandrigenin) neben weniger 3-Acetyl- und 3.16-Diacetyl-gitoxigenin wie aus authentischem Gitoxigenin. (Wir haben bei dieser Gelegenheit gefunden, daß die Acetylierung von in Aceton gelöstem Gitoxigenin mit Acetanhydrid bei Gegenwart von Natriumacetat als Hauptprodukt 3-Acetyl-gitoxigenin und nicht Oleandrigenin liefert!)

Natur und Stellung der Acylgruppe

Als Acylgruppe haben wir naturgemäß wegen des weitverbreiteten Vorkommens der Acetylgruppe zunächst diese vermutet. Für die Stellung der Acylgruppe im Genin war die Hydroxylgruppe in 3 auszuschließen, da sie bekanntermaßen im Gitoxin durch den aus 3 Digitoxose bestehenden Trisaccharid-Rest besetzt ist. Eine 16-Acetyl-Verbindung war jedoch auch auszuschließen, da Gitaloxigenin eindeutig nicht mit Oleandrigenin identisch war, was durch den etwas niedrigeren R_F -Wert und den abweichenden Schmelzpunkt festgestellt wurde. Auch die Acetylierung des Gitaloxigenins mit Acetanhydrid in Pyridin ergibt nicht das erwartete 3.16-Diacetyl-gitoxigenin, sondern ein

¹⁰⁾ W. Neumann, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 1551 [1937].

¹¹⁾ K. Meyer, Helv. chim. Acta 29, 718 [1946].

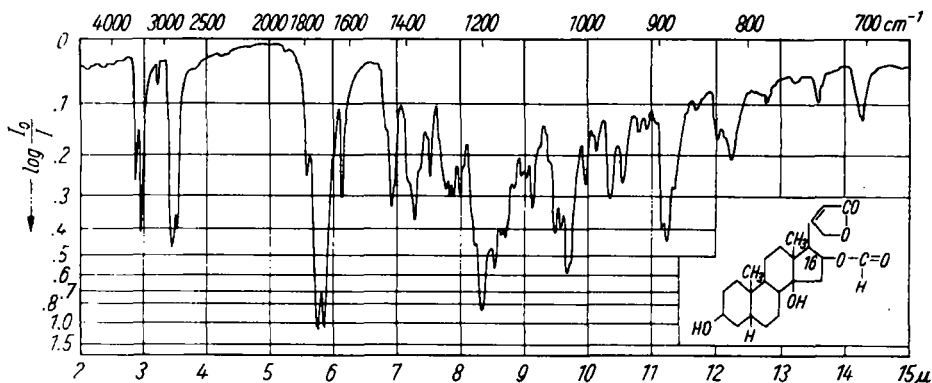
davon abweichendes Produkt mit etwas niedrigerem R_F -Wert. Andererseits entstand bei dieser Acetylierung nur ein einziges Reaktionsprodukt, was eindeutig die ohnedies unwahrscheinliche Möglichkeit ausschließt, daß Gitaloxigenin ein 14-Acyl-gitoxigenin ist, da sonst drei Reaktionsprodukte – 3.14-, 14.16-Diacyl- und 3.14.16-Triacyl-gitoxigenin – zu erwarten wären.

Damit schied die Essigsäure als Acylrest aus. Die Elementaranalysen gaben einen Hinweis, daß Ameisensäure in Frage kommen könnte:

Acetylgitoxin: 62.76%	Formylgitoxin: 62.36%	Gitaloxin: 62.42%
Acetylgitoxigenin: 69.42%	Formylgitoxigenin: 68.87%	Gitaloxigenin: 68.78%

Die folgenden Versuchsergebnisse zeigen, daß mit Gitaloxin und Gitaloxigenin tatsächlich das erste mit Ameisensäure veresterte Herzglykosid und dessen Aglykon aufgefunden worden ist:

1. Die aus Gitaloxin und Gitaloxigenin abgespaltene Ameisensäure konnte nach verschiedenen Methoden identifiziert und quantitativ bestimmt werden.
2. Das IR-Spektrum von Gitaloxigenin zeigt gegenüber dem von Gitoxigenin die folgenden charakteristischen Unterschiede: Die OH-Bande bei 3.03μ ist verschwunden; es bleiben nur zwei OH-Banden bei 2.83μ und 2.92μ übrig. Zur C=O-Valenzschwingung des Lactonrings bei 5.56 bzw. 5.73μ tritt eine



IR-Spektrum von Gitaloxigenin, gemessen in KBr (Perkin-Elmer, Modell 21)

weitere scharf abgetrennte C=O-Bande bei 5.85μ hinzu. Letztere ist gegenüber der C=O-Bande von 16-Acetyl-gitoxigenin bei 5.73μ um 0.12μ nach längeren Wellen verschoben. Dies deutet darauf hin, daß es sich nicht um eine Acetyl-Gruppe handeln kann. Die neu auftretende C=O-Valenzschwingung bei 8.30μ liegt im Formiat-Bereich (8.3μ – 8.5μ) und nicht im Acetat-Bereich (8.0μ – 8.1μ) wie beim 16-Acetyl-gitoxigenin (7.96μ)¹².

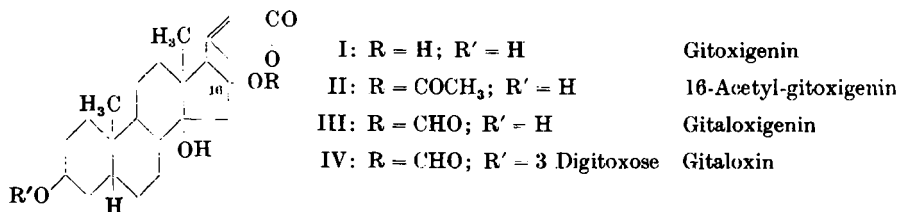
3. Formyliert man in Aceton gelöstes Gitoxigenin mit 98-proz. Ameisensäure bei Zimmertemperatur, so erhält man zwei bisher unbekannte Monoformyl-gitoxigenine und eine Diformyl-Verbindung, in der man das ebenfalls unbekannte 3.16-Diformyl-gitoxigenin erblicken kann. Die R_F -Werte der beiden Mono-Formylverbindungen sind stark voneinander verschieden, jedoch

¹²) L. J. Bellamy, Ultrarotspektren u. chem. Konstitution; Verlag Dietrich Steinkopff, Darmstadt 1955.

liegt jeweils einer sehr nahe unter einem entsprechenden Wert der beiden Mono-acetyl-gitoxigenine. Ebenfalls liegt der R_F -Wert des 3.16-Diformyl-gitoxigenins nahe unter dem Wert für 3.16-Diacetyl-gitoxigenin. Auf diese Weise läßt sich eine vorläufige Zuordnung der beiden Mono-Formylverbindungen als 3-Formyl- bzw. 16-Formyl-Verbindung treffen. Führt man die Formylierung mit Ameisensäure-essigsäure-anhydrid unter Zusatz von Natriumformiat oder einer tertiären Base durch, so bildet sich bevorzugt diejenige Mono-Formylverbindung, die nach der chromatographischen Zuordnung 16-Formyl-gitoxigenin sein sollte. Diese Verbindung erwies sich nach R_F -Wert, Schmelzpunkt und Misch-Schmelzpunkt als mit dem Gitaloxigenin identisch, das somit – da hierbei die 3-Stellung und auch die 14-Stellung ausgeschlossen ist – als ein 16-Formyl-gitoxigenin erwiesen ist.

4. Eine letzte Bestätigung dieses Resultats wird durch die Formylierung des Gitaloxigenins erhalten, bei der nur ein einziges Reaktionsprodukt entsteht, das mit dem in 3. erwähnten 3.16-Diformyl-gitoxigenin nach R_F -Wert, Schmelzpunkt und Misch-Schmelzpunkt identisch ist.

Dem Gitaloxin bzw. Gitaloxigenin kommt daher der nachstehende formelmäßige Aufbau zu:



Künstliche Herstellung von Gitaloxin aus Gitoxin

Durch Einwirkung von Ameisensäure gelingt die Formylierung von Gitoxin nicht, weil in der sauren Lösung zuerst Digitoxose abgespalten wird. Aus dem dabei frei gewordenen Gitoxigenin bilden sich dann die 3-Formyl-gitoxigenine. Durch Einwirkung von Ameisensäure auf in Pyridin gelöstes Gitoxin bei Gegenwart von Acetanhydrid¹³⁾ oder durch Umsetzung von in Dimethylformamid gelöstem Gitoxin mit Ameisensäure-essigsäure-anhydrid bei Gegenwart von geringen Mengen Natriumformiat oder einer tertiären Base bildet sich dagegen Gitaloxin in etwa 60-proz. Ausbeute. Nebenbei entstehen noch, je nach der Menge des eingesetzten Anhydrids, mehr oder weniger höher formylierte Gitoxine, die demnach Formylreste an den Zuckerresten enthalten.

Das 16-Formyl-gitoxin erhält man in reinem Zustand nach Auftrennung eines solchen Reaktionsgemisches an Formamid-Cellulose-Säulen mit Cyclohexan-Tetrahydrofuran 1:1. Es ist in allen Eigenschaften mit dem aus „Verodigen“ isolierten Gitaloxin identisch.

Bedeutung und Vorkommen des Gitaloxins in der Droge

Wir haben für das 16-Formyl-gitoxin die Bezeichnung Gitaloxin in Anlehnung an das Kraftsche Gitalin gewählt, weil wir es als verantwortlich

¹³⁾ R. Tschesche u. G. Grimmer, Privatmitteilung.

für eine Reihe von Eigenschaften chemischer und pharmakologischer Art erkannt haben⁸⁾, die z. Tl. von F. Kraft¹⁾ und W. Straub¹⁴⁾ bereits festgestellt worden sind.

Wenn nunmehr „Gitalin“ als Bezeichnung für ein Hauptglykosid – wie mehrfach gefordert^{2, 15)} – nicht mehr verwendet werden soll, so bestehen andererseits keine Bedenken, für die Mischung der nach Kraft hergestellten Digitalis-Glykoside den Ausdruck „Gitalin-Fraktion“ beizubehalten. Dabei ist aber zu beachten, daß eine echte Gitalin-Fraktion nicht einfach der mit Chlorkohlenwasserstoffen ausgezogene und gereinigte Kaltwasser-Extrakt aus irgendwelchen *Digitalis-purpurea*-Blättern ist.

Digitalis-purpurea-Drogen unterscheiden sich bekanntlich häufig beträchtlich in ihrem Gehalt an Hauptglykosiden und – wie wir gefunden haben – besonders im Gehalt an Gitaloxin. So enthalten Pflanzen, aus denen man die echte „Gitalin-Fraktion“ (wie sie im „Verodigen“ vorliegt) herstellen kann, Gitaloxin in Mengen zwischen 25 und 40% der Summe von Digitoxin + Gitoxin + Gitaloxin. Sie eignen sich natürlich auch am besten zur Darstellung des Gitaloxins.

Häufig findet man aber Drogen, bei denen der Gitaloxin-Gehalt nur etwa 10 bis 25% der Summe der drei Hauptglykoside ausmacht. Nach unseren bisherigen Beobachtungen handelt es sich bei den erstgenannten Drogen meist um solche, die in Mittel- und Südosteuropa beheimatet sind, während die Sorten mit wenig Gitaloxin, die aber gelegentlich besonders reich an Digitoxin sind, häufig aus West- und Südwesteuropa stammen.

Über die Konsequenzen, die sich nach Kenntnis des Gitaloxins und nach unseren Ergebnissen aus der quantitativen Einzelbestimmung der drei Hauptglykoside für die chemische und biologische Bewertung von *Digitalis-purpurea*-Drogen ergeben, berichten wir ausführlich an anderer Stelle⁹⁾.

Aus der Kenntnis der genuinen Glykoside Purpureaglykosid A und B, aus denen Digitoxin und Gitoxin erst durch fermentative Abspaltung von Glucose entstehen, ergibt sich die Frage nach der Existenz eines entsprechenden Primärglykosids des Gitaloxins. Wir haben dazu folgendes gefunden:

Papierchromatogramme (entwickelt mit Chloroform-Tetrahydrofuran 1:1 auf Formamidpapier) von unter Ausschaltung der Fermenteinwirkung hergestellten Extrakten der *Digitalis purpurea* zeigen, zwischen den Purpureaglykosiden A und B liegend, den kräftigen Fleck (R_F 0.35) eines Gitoxigeninderivates. Nach schwach alkalischer Behandlung (mit verd. Ammoniak) dieser aus mehreren Chromatogrammen ausgeschnittenen und eluierten Substanz findet man bei erneuter Chromatographie nunmehr das Purpureaglykosid B. Unter den gleichen Bedingungen läßt sich auch Gitaloxin entacylieren, nicht aber z. B. Acetylgitoxin. Saure Hydrolyse liefert Gitoxigenin und die Zucker Digitoxose und Digalindibiose.

Man kann daher jetzt schon mit ziemlicher Sicherheit sagen, daß das genuine Glykosid Glucogitaloxin in den *Digitalis*-Blättern enthalten ist. Mit der Isolierung dieser Substanz sind wir zur Zeit beschäftigt.

¹⁴⁾ Dtsch. med. Wschr. 45, 281 [1919]. ¹⁵⁾ W. Küssner, Pharmazie 5, 76 [1950].

Für die Aufnahme und Diskussion der IR-Spektren sind wir Herrn Dr. Otting vom Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, sowie dem Leiter des Instituts, Herrn Prof. R. Kuhn, zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche

Lösungsmittel: Die zur Verteilungschromatographie verwendeten Lösungsmittel werden alle – mit Ausnahme von Formamid – vor Gebrauch destilliert. Die Lösungsmittelsysteme werden durch Mischen der Komponenten im jeweils erforderlichen Verhältnis unter Zusatz von etwas mehr als der zur Sättigung notwendigen Menge Formamid hergestellt.

Imprägnierung des Cellulosepulvers: In einer Nutsche wird Cellulosepulver Schleicher & Schüll Nr. 123 mit soviel einer 40-proz. Lösung von Formamid in Aceton versetzt, daß es von der Flüssigkeit vollständig bedeckt ist. Die Saugflasche ist mit der abgestellten Wasserstrahlpumpe verbunden, um ein Abfließen der Lösung zu verhindern. Der Cellulosebrei wird zur Entfernung von Luft einschlämmt mit einem Porzellanlöffel mehrmals durchgerührt und nach 15 Min. unter ständigem Abpressen scharf abgesaugt. Dann wird der gepreßte Cellulosekuchen im Abzug auf einem großen Filterbogen zerteilt, vor einem mäßig fächernden Heizventilator ausgebreitet und gut aufgelockert. Wenn das Aceton vollständig verdunstet ist, wird das formamidfeuchte Pulver entweder direkt in die Chromatographiersäule, oder auf Vorrat in Flaschen gefüllt.

Füllung der Säulen zur Verteilungschromatographie: Als Chromatographiersäulen verwenden wir Glasröhren verschiedener Ausmaße (Länge 30–70 cm, Durchmesser 2–7 cm), die am unteren Ende mit einem Glashahn versehen sind. Das Formamidpapier wird nicht mit der jeweils zu verwendenden Lösungsmittelphase eingeschlammmt, sondern direkt portionsweise eingefüllt und so eingestampft, daß fest aneinandergepreßte Schichten von 1–2 cm Dicke entstehen. Zum Einstampfen benutzen wir Stäbe aus nicht-rostendem Stahl, an deren unterem Ende eine genau in das Säulenrohr passende Stahlscheibe angeschraubt ist. 100 cm sorgfältig gefüllter Säule enthalten etwa 70 g Formamidpapier. Wenn die Cellulosesäule die gewünschte Höhe erreicht hat, wird die letzte Schicht nicht mehr festgestampft, sondern nur locker eingefüllt.

Das zu trennende Substanzgemisch wird nun in Chloroform gelöst, mit Formamid-cellulose zu einem Brei verrührt, in einer flachen Porzellanschale ausgebreitet und so lange mittels eines Heizventilators belüftet, bis das Chloroform verdunstet ist. Anschließend wird die nun mit der Substanz beladene Cellulose auf die oberste lockere Schicht der Säule aufgebracht und mit dieser zusammen festgedrückt. Ein 2–3 cm hohes Polster von Formamidcellulose bildet den Abschluß der Säule. Je nach der Länge des Rohres bleiben dann 3–10 cm des oberen Raumes leer.

Isolierung des Gitaloxins: 1. Säulen von 65 cm Länge und 7 cm Durchmesser werden in der oben beschriebenen Weise mit Formamidcellulose 55 cm hoch gefüllt und mit 7 g „Verodigen“ beschickt. Die Säulen werden dann mit dem Lösungsmittelgemisch Xylol-Methyläthylketon 1:1 genau wie ein Papierchromatogramm⁹⁾ entwickelt, bis die Lösungsmittelfront das untere Ende erreicht hat. Nun befindet sich das Gitaloxin, entsprechend seinem R_F -Wert (0.55), etwa in der Mitte der Säule. Man hebt nun ungefähr 23 cm (R_F 0.40) der Cellulosefüllung ab. Dazu verwenden wir genau in die Röhre passende Stahlscheiben mit einem radialen Einschnitt. Die beiden Kanten des Einschnittes sind sägeartig leicht geschränkt. Durch Drehen der an einem Stahlstab angeschraubten Scheibe läßt sich das Cellulosepulver mit glattem Schnitt portionsweise abschneiden und ausheben.

Der in den Säulen verbleibende Teil dieser „absteigenden Chromatogramme“, der die Cardenolide Gitoxygenin, Gitaloxin, Digitoxin, Gitaloxigenin und Digitoxigenin enthält, wird mit Tetrahydrofuran eluiert. Die Elutionslösung wird i. Vak. eingengt, die zurückbleibende Formamidlösung mit reichlich Wasser versetzt und mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Einengen der mit Wasser gewaschenen Chloroformlösung

nimmt man den Trockenrückstand (etwa die Hälfte des eingesetzten Verodigens) in Aceton auf und versetzt mit viel Äther. Nach wenigen Minuten bildet sich ein Niederschlag, der sich beim Stehenlassen im Eisschrank über Nacht noch vermehrt. Dieser Niederschlag enthält als Hauptmenge Gitaloxin und Digitoxin neben nur wenig der oben genannten Cardenolide. Er dient als Ausgangsmaterial für die Reindarstellung des Gitaloxins.

2. Eine Säule von 65 cm Länge und 4.2 cm Durchmesser, die mit etwa 550 g Formamidcellulose bis zu einer Höhe von 55 cm gefüllt ist, wird mit 2 g dieses Gitaloxin-Digitoxin-Gemisches in der oben beschriebenen Weise beschickt. Als Lösungsmittelsystem dient Cyclohexan-Tetrahydrofuran 1:1, gesättigt mit Formamid. Dieses hat nach etwa 150 Min. die Säule durchlaufen. Die nun abtropfende Flüssigkeit wird in einem Auffanggefäß gesammelt, während man laufend Proben davon mit der Keller-Kiliani-Reaktion auf etwa auftretende Cardenolide prüft. Wenn die Reaktion positiv ausfällt, setzt man einen Fraktionssammler in Betrieb.

Mit dem Fraktionssammler „Fractomat Y-2“*) fangen wir das Eluat in Portionen zu 15 cm auf. Jede fünfte Fraktion wird papierchromatographisch geprüft (Xylol-Methyläthylketon 1:1 auf Formamidpapier). Die Verteilung der getrennten Komponenten auf die einzelnen Fraktionen schwankt von Säule zu Säule, was im wesentlichen durch die nie völlig identische Packung des Cellulosepulvers verursacht wird. In den ersten Fraktionen befindet sich Digitoxigenin. Dann folgt Digitoxin zusammen mit wenig Gitaloxigenin. Digitoxin in reiner Form tritt bis zu den Fraktionen 80–100 aus, gefolgt von 20 bis 30 Überschneidungsfractionen, die wenig Digitoxin und Gitaloxin enthalten. Reines Gitaloxin findet sich in den nächsten 100 Fraktionen. Insgesamt werden also 3 bis 3.5 l Lösungsmittel benötigt. Zur Aufarbeitung werden schließlich die Fraktionen gleicher Art zusammengegeben und i. Vak. eingengt, bis eine Formamidrestlösung zurückbleibt. Die Lösung wird mit reichlich Wasser versetzt und mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung wird mit Wasser gewaschen und zur Trockene eingengt. Die Trockenrückstände der nur Gitaloxin oder Digitoxin enthaltenden Fraktionen werden aus Aceton-Petroläther umkristallisiert. Die Kristallisationsmutterlauge des Gitaloxins können zusammen mit etwa aufgetretenen Überschneidungsfractionen Gitaloxin-Digitoxin bei der nächsten Trennung neuen Ausgangsmaterials wieder eingesetzt werden.

Aus 2 g Substanz erhält man so 500–600 mg reinstes Gitaloxin und 600 bis 700 mg reinstes Digitoxin. – Es können ohne weiteres auch größere Säulen verwendet werden. Wir haben an einer Säule von 65 cm Länge und 7 cm Durchmesser 6 g Digitoxin-Gitaloxin-Gemisch mit gleich gutem Trenneffekt chromatographiert.

$[\alpha]_D^{25}:-7^\circ (\pm 1^\circ)$ (Pyridin). $\lambda_{\max} = 216 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4.19$)

$\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_{15}$ (808.9) Ber. C 62.36 H 7.98 CHO 3.59 Gef. C 62.42 H 8.14 CHO 3.46

Gitaloxin schmilzt bei 250–253° und ist gut löslich in Chloroform, Pyridin, Methanol, Aceton. Praktisch unlöslich ist es – wie die meisten Cardenolide – in Äther, Petroläther und sonstigen aliphatischen Kohlenwasserstoffen.

Isolierung des Gitaloxigenins: Gitaloxigenin kann aus der noch Digitoxin, Gitaloxin, Digitoxigenin und Nichtcardenolide enthaltenden Aceton-Äther-Mutterlauge (vergl. Isolierung des Gitaloxins I)) infolge seines mit Digitoxin identischen R_F -Wertes von diesem an Cellulosesäulen nicht getrennt werden.

Bei der Chromatographie an Aluminiumoxyd, das Digitoxin sehr viel stärker adsorbiert als Gitaloxigenin, besteht aber die Gefahr der Entacylierung. Wir drücken den dadurch unvermeidlich auftretenden Verlust auf ein Minimum herab, indem wir die zur Trockene gebrachte Mutterlauge in Chloroform lösen und mit Chloroform + 2% Methanol durch eine nur 2–3 cm dicke Schicht von neutralem Aluminiumoxyd „Woelm“ laufen lassen. Gitaloxigenin erscheint dann zusammen mit Digitoxigenin und Verunreinigungen, aber frei von Digitoxin, in den ersten Durchlaufractionen und ist auf diese Weise nur kurze Zeit mit relativ wenig Adsorbens in Kontakt gewesen. Die Trennung des Gitaloxigenins von Digitoxigenin läßt sich nunmehr an Formamidcellulose-Säulen mit Heptan-

*) Hersteller: Kas. Haiss, Kom. Ges., Jungingen (Hohenzollern).

(Chloroform 1:2 auf im Prinzip gleiche Weise wie oben geschildert (Isolierung des Gitaloxins 2)) durchführen.

$\lambda_{\max} = 216 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4.19$), Schmp. 215–217°
 $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_6$ (418.5) Ber. C 68.87 H 8.19 CHO 6.93
 Gef. C 68.78, 68.87 H 8.00, 8.31 CHO 6.81

Gitaloxigenin. a) aus Gitaloxin: 500 mg Gitaloxin werden in 170 ccm Aceton gelöst, mit 50 ccm 0.1 *n* HCl versetzt und 30 Min. unter Rückfluß erhitzt. Das Reaktionsgemisch enthält außer Gitaloxigenin noch ziemlich viel nicht umgesetztes Gitaloxin, aber auch bereits etwas Gitoxigenin und Gitoxin. Die Reaktion muß an dieser Stelle abgebrochen werden, da sonst die begonnene Entacylierung des Gitaloxigenins schnell weiter fortschreitet und man schließlich nur Gitoxigenin erhalten würde. Die Lösung wird nun i. Vak. auf etwa $\frac{1}{3}$ eingengt, mit 200 ccm Wasser versetzt und dreimal mit je 50 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung wird nach Waschen mit Wasser i. Vak. zur Trockene eingengt. Aus den Reaktionsgemischen von zwei solchen Ansätzen haben wir nach Säulentrennung mit Heptan-Chloroform 1:2 und Kristallisation aus Aceton-Petroläther 280 mg Gitaloxigenin vom Schmp. 215–217° in glänzenden Blättchen isoliert.

b) aus Gitoxigenin: 200 mg Gitoxigenin werden in 5 ccm Dimethylformamid gelöst, mit 1.5 ccm Ameisensäure-essigsäure-anhydrid und 20 mg Natriumformiat versetzt und 2 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wird die Lösung in 100 ccm Wasser gegossen und dreimal mit 20 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung wird nach mehrmaligem Waschen mit Wasser i. Vak. zur Trockene eingengt. Nach Verteilungschromatographie an Formamidcellulose mit Heptan-Chloroform 1:2 und Umkristallisation aus Aceton-Petroläther erhält man 90 mg Gitaloxigenin. Die anderen Säulenfraktionen enthalten 3-Formyl- und 3.16-Diformyl-gitoxigenin in geringer Menge. Zu ihrer Darstellung ist die folgende Methode besser geeignet:

3-Formyl-gitoxigenin, 3.16-Diformyl-gitoxigenin: 2.1 g Gitoxigenin werden in 70 ccm Aceton und 180 ccm 98-proz. Ameisensäure gelöst und 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der größte Teil des Acetons wird dann i. Vak. schnell abgezogen und die Lösung in 2 l Wasser gegossen. Nach dem üblichen Ausziehen mit Chloroform, Waschen mit Wasser und Einengen der Lösung bekommt man einen Rückstand, der als Hauptprodukte – neben noch reichlich nicht umgesetztem Gitoxigenin – 3-Formyl- und 3.16-Diformyl-gitoxigenin enthält. Bei der Fraktionierung an Formamidcellulose mit Heptan-Methyläthylketon 1:1 und Kristallisation aus Aceton-Petroläther fallen 380 mg 3.16-Diformyl-gitoxigenin, Schmp. 220–224°, 520 mg 3-Formyl-gitoxigenin, Schmp. 207–210°, und 80 mg Gitaloxigenin, Schmp. 213–215°, an.

3-Formyl-gitoxigenin, $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_6$ (418.5) Ber. C 68.87 H 8.19
 Gef. C 68.95 H 8.24

3.16-Diformyl-gitoxigenin, $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (446.5) Ber. C 67.24 H 7.69
 Gef. C 66.91 H 7.63

Auf den Papierchromatogrammen sind bereits vor Behandlung mit Trichloressigsäure 4 weitere Flecken mit blauer Fluoreszenz zu erkennen. Es handelt sich dabei sehr wahrscheinlich um formylierte Anhydrogitoxigene.

3-Acetyl-16-formyl-gitoxigenin wird nach 30stdg. Reaktion von 20 mg in 1 ccm Aceton gelöstem Gitaloxigenin mit 1 ccm Acetanhydrid und 20 mg Natriumacetat erhalten.

3-Formyl-16-acetyl-gitoxigenin bekommt man durch Umsetzung von 20 mg 16-Acetyl-gitoxigenin in 1 ccm Aceton mit 1 ccm 98-proz. Ameisensäure während 120 Minuten.

Die beiden gemischten Acylgitoxigene dienen zu papierchromatographischen Vergleichen. Sie wurden nicht isoliert und analysiert.

Gitaloxin aus Gitoxin: Bei der Formylierung des Gitoxins ist zu berücksichtigen, daß die 4 noch freien Hydroxylgruppen der drei Digitoxosen ebenfalls der Veresterung zugänglich sind. Je nach den Mengenverhältnissen der Reaktionspartner und der Dauer

der Reaktion kann man die Umsetzung so leiten, daß entweder eine weitgehende Formylierung des gesamten Moleküls, oder im wesentlichen nur eine Veresterung am Aglykonteil eintritt. Für die Ausbeute an Gitaloxin am günstigsten erweist sich die folgende Methode: 4 g Gitoxin werden in 200 ccm Dimethylformamid gelöst, mit 20 ccm Ameisensäure-essigsäure-anhydrid und 400 mg Natriumformiat versetzt und 120 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. — Das Reaktionsgemisch enthält 60% Gitaloxin, 13% höher formylierte Produkte und 27% nicht umgesetztes Gitoxin. Die Lösung wird in 600 ccm Wasser gegossen und dreimal mit je 100 ccm Wasser gewaschen. Die Lösung wird i. Vak. eingengt, bis ein fester Rückstand und 3–4 ccm Dimethylformamid zurückbleiben. Durch Zusatz von wenig Dimethylformamid bringt man alles in Lösung und gießt in 500 ccm Wasser ein. Der dabei ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen, getrocknet und verteilungschromatographisch mit Cyclohexan-Tetrahydrofuran 1:1 aufgearbeitet. Aus den vereinigten Gitaloxin-Fractionen der Säulentrennung gewinnt man nach Umkristallisieren mit Aceton-Petroläther 2 g reines Gitaloxin.

Papierchromatographie der acylierten Gitoxigenine: Als Grundlage dient das Verfahren von F. Kaiser⁹). Für die Papierchromatographie der durch Formylierung und Acetylierung von Gitoxigenin präparativ erhaltenen Acylgitoxigenine sind einige neue Lösungsmittelgemische eingesetzt worden. Die Chromatogramme werden auf „kleinen Streifen“ (9.8×28 cm) entwickelt. Wegen der z. T. nur sehr geringen Unterschiede der R_F -Werte ist es erforderlich, von zu vergleichenden Substanzen immer gleich mehrere Chromatogramme in verschiedenen Lösungsmitteln herzustellen, damit wiederkehrende R_F -Differenzen die notwendige Sicherheit in der Unterscheidung geben.

Die in der folgenden Tafel verzeichneten R_F -Werte sind Durchschnittswerte aus einer großen Anzahl von Einzelchromatogrammen. Die durch Acetylierung von Gitaloxigenin und Formylierung von 16-Acetyl-gitoxigenin (Oleandrigenin) erhaltenen gemischten Acyl-derivate 3-Acetyl-16-formyl-gitoxigenin und 3-Formyl-16-acetyl-gitoxigenin sind nicht isoliert, sondern nur papierchromatographisch nachgewiesen worden.

R_F -Werte von Acylgitoxigeninen in verschiedenen Lösungsmittelgemischen

Substanz	$R_F \times 100$			
	I	II	III	IV
Gitoxigenin	13	2	0	0
16-Formyl-gitoxigenin	25	4.5	2.7	7.8
16-Acetyl-gitoxigenin	29	7.0	5.4	10
3-Formyl-gitoxigenin	38	11	8	13
3-Acetyl-gitoxigenin	47	17	13	19
3.16-Diformyl-gitoxigenin	56	25	19	24
3.16-Diacetyl-gitoxigenin	72	50	37	39
3-Acetyl-16-formyl-gitoxigenin ..	67	38	29	31
3-Formyl-16-acetyl-gitoxigenin ..	65	36	27	29

I: Cyclohexan-Tetrahydrofuran 3:1	} gesättigt mit Formamid
II: Cyclohexan-Tetrahydrofuran 4:1	
III: Dekalin-Tetrahydrofuran 2:1	
IV: Heptan-Methyläthylketon 3:2	

Identifizierung und Nachweis der aus Gitaloxin und Gitaloxigenin abgespaltenen Ameisensäure

a) Papierchromatographisch: 50 mg Gitaloxigenin werden in 1 ccm Methanol gelöst und mit 0.3 ccm konz. NH_3 + 0.7 ccm H_2O versetzt. Nach 2 Stunden werden Proben dieser Lösung im Vergleich mit Ammoniumformiat in 3 Lösungsmittelgemischen

papierchromatographiert. Die Flecken werden mit ammoniak. AgNO_3 sichtbar gemacht. Sie sind in R_F -Wert und Reaktion mit Ammoniumformiat identisch.

1. Äthanol-Wasser-konz. NH_3 80:16:4, R_F 0.63
2. *tert.*-Butanol-Wasser-konz. NH_3 80:16:4, R_F 0.30
3. Isopropylalkohol-1*n* NH_4OH 3:2, R_F 0.57

b) Im Destillat der wie üblich durchgeführten Mikroacetylbestimmung nach E. Wiesenberger¹⁶⁾ wird die Spaltsäure auf verschiedene Weise als Ameisensäure identifiziert:

1. durch potentiometrische Titration: der p_K -Wert (p_H -Wert bei halber Neutralisation) erweist sich als identisch mit dem p_K -Wert der Ameisensäure.

Gefunden: p_K 3.7 (Ameisensäure: p_K 3.7, Essigsäure: p_K 4.7)

2. durch die Farbreaktion mit Chromotropsäure¹⁷⁾ nach Reduktion des Destillats mit Magnesium in salzsaurer Lösung.

3. durch das IR-Spektrum des Eindampfrückstandes des mit Natronlauge neutralisierten Destillates: Das Spektrum erweist sich als identisch mit dem Spektrum von Natriumformiat.

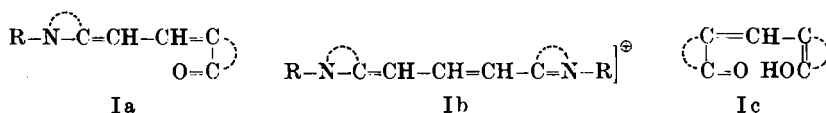
198. Johannes Brunken und Günther Bach*): Synthesen in der Imidazolon-Reihe

[Aus dem VEB Filmfabrik AGFA Wolfen]

(Eingegangen am 4. Februar 1956)

Durch Reaktion von Orthocarbonsäureestern mit α -amino-substituierten Acetamiden bzw. Glycinamiden hergestellte 1,2-disubstituierte Imidazolone-(4 bzw. 5) werden auf ihre Brauchbarkeit als Ausgangsprodukte für Sensibilisierungsfarbstoffe untersucht.

Merocyanine sind als Kreuzungsprodukte von Oxonolen und Cyaninen aufzufassen. Im Falle der Dimethin-merocyanine handelt es sich um eine Kreuzung von Trimethin-cyaninen und Monomethin-oxonolen entsprechend den allgemeinen Formeln Ia, b, c.



Als Ausgangsprodukte werden heterocyclische Verbindungen mit reaktionsfähiger Ketomethylen-Gruppierung, z. B. Rhodanin- oder Thiohydantoin-Derivate, verwendet. Falls letztere eine weitere kondensationsfähige Gruppe enthalten, lassen sich daraus hergestellte Merocyanine zu drei- und mehrkernigen Farbstoffen, Merocyaninen höherer Ordnung¹⁾, weiterkondensieren. Von besonderem Interesse sind Farbstoffe der allg. Formel II ($\text{Y} = \text{S}, \text{O}, \text{NR}$,

¹⁶⁾ Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta **33**, 51 [1948].

¹⁷⁾ F. D. Snell u. C. T. Snell, Colorimetric Methods of Analysis, 3. Aufl., Bd. III, S. 304, D. Van Nostrand Company, Inc., New York 1953.

*) Ein Teil der Arbeit ist ein Auszug der Dissertation des einen von uns. Wir danken auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. W. Treibs, Leipzig, für die Übernahme des Referates und für das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse.

¹⁾ Vergl. P. Käinrath, Angew. Chem., Ausg. A **60**, 36 [1948].