

RUDOLF TSCHESCHE, BUNRUEANG NIYOMPORN
und HANS MACHLEIDT

Über pflanzliche Herzgifte, XXXVIII¹⁾

Zur Stellung der Acetylgruppe in den Lanatosiden
und Acetyldigoxinen

Aus der Biochemischen Abteilung des
Organisch-Chemischen Instituts der Universität Hamburg

(Eingegangen am 31. Mai 1959)

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Stefan Goldschmidt zum 70. Geburtstag gewidmet

Durch Säurehydrolyse wurde aus Lanatosid A Acetyl-digilanidobiose erhalten und damit die Stellung der Acetylgruppe in der mit der Glucose verknüpften Digitoxose gesichert. Permethyliertes Lanatosid A ergab bei der Hydrolyse Cymarose, die Zucker sind daher in 1.4-Stellung verknüpft. Bei der Abtrennung der Glucose zu den Desgluco-lanatosiden entsteht zunächst die α -Form mit 3-Stellung der Acetylgruppe in der 3. Digitoxose. Die Umlagerung in die β -Form besteht in einer Wanderung des Acyls nach 4, vermutlich über ein Orthoacetat.

Durch die Untersuchungen von A. STOLL und W. KREIS²⁾ ist für die Lanatoside A, B und C aus *Digitalis lanata* bekannt, daß sie sich aus einem Aglykon (Digitoxigenin, Gitoxigenin bzw. Digoxigenin), 3 Moll. D-Digitoxose, 1 Mol. D-Glucose und 1 Mol. Essigsäure aufbauen. Die Glucose ist endständig gebunden und kann enzymatisch mit Digilanidase abgetrennt werden^{2,3)}, wobei die Acetylgruppe im Restmolekül verbleibt. Die Desgluco-glykoside Acetyl-digitoxin, Acetyl-gitoxin und Acetyl-digoxin treten in 2 Formen auf (α und β), die sich bereits beim Erhitzen in Methanol ineinander überführen lassen. Da im Acetyl-digitoxin für die Acetylgruppe im Aglykonteil außer an der wenig wahrscheinlichen tertiären Hydroxylgruppe an C-14 keine Bindungsmöglichkeiten mehr bestehen, ist ihre Verknüpfung mit einem der Digitoxose-Moleküle zu vermuten. D. H. GREGG und O. GISVOLD⁴⁾ haben angenommen, daß die in der Zuckerkette endständige Digitoxose die Acetylgruppe enthält, da die beim Digitoxin, Gitoxin und Digoxin papierchromatographisch positive Reaktion auf *cis*-Glykole mit Perjodat/Benzidin bei den Acetyl-digoxinen negativ ausfällt. Es war wünschenswert, diese Annahme durch Isolierung der Acetyl-digilanidobiose zu stützen; das sollte möglich sein, da aus den Arbeiten von A. STOLL und W. KREIS²⁾ hervorging, daß die Acetylgruppe unter sauren Bedingungen nur relativ langsam

¹⁾ XXXVII. Mitteil.: R. TSCHESCHE, G. SNATZKE und G. GRIMMER, Naturwissenschaften 46, 263 [1959].

²⁾ Helv. chim. Acta. 35, 1318 [1952] (dort weitere Literatur).

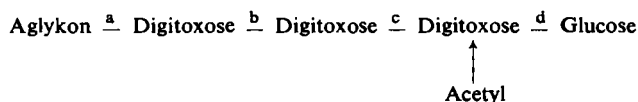
³⁾ A. STOLL, A. HOFMANN und W. KREIS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 235, 249 [1935].

⁴⁾ J. Amer. pharmac. Assoc. 43, 109 [1954].

abhydrolysiert wird. Die Digilanidobiose selbst ist bereits isoliert worden²⁾. Ferner schien es möglich, damit einen Einblick in die Konstitution der α - und β -Desgluculanatoside zu gewinnen und eine Erklärung für die Existenz der beiden Reihen von Acetylderivaten zu finden.

Unter papierchromatographischer Kontrolle wurde zunächst das günstigste Hydrolysen-gemisch ermittelt, mit dem eine Abspaltung des Aglykons, der Glucose und der beiden Digitoxosen unter möglichster Intakthaltung der Acetyl-digilanidobiose erfolgte. Als die besten Bedingungen erwiesen sich 0.2 *n* HCl im Wasser/Methanol-Gemisch 1:1, 30 Min. langes Erhitzen bei 90–100° und 15 Min. lange Nachhydrolyse nach Entfernen des Methanols bei Zugabe des gleichen Volumens Wasser. Im Papierchromatogramm traten mit dem Zuckergemisch im System *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3) (Gemisch I) außer den Flecken der Glucose (R_F -Wert 0.18) und Digitoxose (0.62), 3 weitere Flecken mit den R_F -Werten 0.25, 0.42 und 0.80 auf. Eventuell auch noch zu erwartende Tri- und Tetrasaccharide bzw. deren Acetylderivate ließen sich wegen mangelnder Anfärbbarkeit mit Anilinphthalat nicht feststellen. Die dem Fleck mit dem R_F -Wert 0.25 entsprechende Substanz konnte unter präparativen Bedingungen isoliert und als die schon bekannte Digilanidobiose²⁾ ermittelt werden. Durch alkalische und saure Hydrolyse der Verbindungen mit den R_F -Werten 0.42 und 0.80 ließ es sich wahrscheinlich machen, daß es sich bei der Substanz mit dem R_F -Wert 0.42 um die gesuchte Acetyl-digilanidobiose handeln mußte, während 0.80 der Acetyl-digitoxose zukommen sollte.

Das Zuckergemisch aus 4.5 g Lanatosid A lieferte bei einer Verteilungschromatographie an Cellulosepulver im oben erwähnten Lösungsmittelgemisch neben kristallisierter Digitoxose und Digilanidobiose die gesuchte Mono-acetyl-digilanidobiose, die aus Essigester kristallisiert erhalten werden konnte. (Schmp. 144–146.5°, $[\alpha]_D^{20}$: +49.6° (Wasser), +56.7° (Methanol)). Auf Grund der papierchromatographischen Kontrollen und der Isolierung der Acetylbiase läßt sich der Hydrolysenverlauf wie folgt darstellen:



Die Bindungen a, b und c wurden rasch gespalten, anschließend erfolgte die Abtrennung der Acetylgruppe aus der Acetyl-digilanidobiose, die in Digilanidobiose überging. Nur ein sehr kleiner Teil wurde in Acetyl-digitoxose und Glucose zerlegt. Die Acetyl-digitoxose verlor ihre Acetylgruppe langsam unter Bildung von Digitoxose. Digilanidobiose ließ sich unter den Hydrolysenbedingungen am schwersten spalten. Sie wurde daher neben Digitoxose und Glucose als Hauptprodukt gefunden.

Um den Unterschied der beiden Reihen α und β der Desgluculanatoside zu untersuchen, schien es zunächst wünschenswert, die vermutete 1.4-glykosidische Verknüpfung der Zucker zu sichern. Da Digitoxin eine positive Perjodatreaktion lieferte, die Lanatoside und Acetyl-digoxin damit jedoch negativ reagieren, sollten sowohl die dritte Digitoxose (c) wie die Glucose in pyranosider Form vorliegen. Die positive Perjodatreaktion von Digitoxigenin-mono- und -bis-digitoxosid bestätigten für die anderen Digitoxosemolekeln diese Annahme. Noch nicht gesichert dagegen war die Verknüpfung der Zucker untereinander, die auch über eine 1.3-Bindung erfolgen kann.

Zur Klärung dieser Frage bot sich die Methode der Permethylierung nach R. KUHN, H. TRISCHMANN und I. LÖW⁵⁾ unter Verwendung von Methyljodid und Silberoxyd in Dimethylformamid an. In dieser Weise permethyliertes, amorphes Lanatosid A ergab nach der Hydrolyse papierchromatographisch 3 Flecke (R_F 0.60, 0.71 und 0.77), die der Digitoxose und der Cymarose^{*)} zugeordnet werden konnten; der Fleck mit dem R_F -Wert 0.77 war jedoch nicht die erwartete 2.3.4.6-Tetramethyl-glucose (R_F -Wert 0.80), wahrscheinlich handelte es sich hierbei um eine methylierte Digilanidobiose, die nur bei der Permethylierung der Lanatoside beobachtet wurde. Da nur Cymarose (3-Methyl-digitoxose) und keine Isocymarose gefunden wurde, schied eine 1.3-Verknüpfung der Zucker aus. Das Auftreten der Digitoxose mußte auf eine unvollständige Methylierung zurückgeführt werden; sie trat nur in geringen Mengen auf und wurde auch bei der Hydrolyse von permethyliertem Digitoxin, Gitoxin, Desacetyl-lanatosid A und α - und β -Acetyl-digoxin neben Cymarose beobachtet. Als weiteres Hydrolysenprodukt wurde bei diesen methylierten Glykosiden mit Ausnahme des Desacetyl-lanatosids A eine 3.4-Dimethyl-digitoxose vom R_F 0.81 ermittelt, welche aus der endständigen Digitoxose stammen muß.

Für die Papierchromatographie dieser Zuckerderivate hat sich vor allem das Lösungsmittelsystem Isobutylalkohol/Wasser (1:1) (Gemisch II) bewährt, in dem auf- wie absteigend gearbeitet werden konnte. Ferner wurde die Papierchromatographie mit dem Lösungsmittelgemisch Isobutylalkohol/Tetrachlorkohlenstoff/Wasser (10:2:10) (Gemisch III) durchgeführt, wenn die Auftrennung von mehr unpolaren Zuckerderivaten notwendig wurde. Im Gemisch III läuft die Digitoxose relativ kurz, R_F 0.33. Der Nachweis der Desoxyzucker auf dem Papier wurde mit Antimontrichlorid geführt, welches im Gegensatz zu Anilinththalat empfindlicher ist und die Zersetzungsprodukte aus der Hydrolyse nicht anfärbt. Man erhält im Tageslicht gut sichtbare dunkle Flecke, welche sich durch eine starke rote Fluoreszenz unter der UV-Lampe auszeichnen.

Es war weiter zu entscheiden, welches der beiden α - und β -Desgluco-lanatoside bei der Abspaltung der endständigen Glucose zunächst entsteht. Bei der fermentativen Hydrolyse hatten A. STOLL, A. v. WARTBURG und W. KREIS⁶⁾ aus Lanatosid B das α -Acetyl-gitoxin als Hauptprodukt erhalten. Es könnte daher das primäre Spaltprodukt mit einer 3-ständigen Acetylgruppe in der 3. Digitoxose-Molekel versehen sein. Ein Vergleich der molekularen Drehungsdifferenzen⁷⁾ der sich von den Lanatosiden ableitenden Glykoside gibt hierüber Auskunft.

Vergleicht man die Werte der Tab. 1, A mit denen von Tab. 1, B, so zeigt nur die α -Form eine befriedigende Übereinstimmung der molekularen Drehungsdifferenzen der Lanatoside mit den entsprechenden Desacetylderivaten. Damit sollte die β -Form diejenige sein, die ihre Entstehung einer Umlagerung verdankt. Diese dürfte wahrscheinlich allein in einer Wanderung der Acetylgruppe²⁾ von der 3- nach der 4-Stellung

⁵⁾ Angew. Chem. **67**, 32 [1955]. ⁶⁾ Helv. chim. Acta. **35**, 1324 [1952].

⁷⁾ D. H. BARTON, J. chem. Soc. [London] **1945**, 813.

^{*)} *Anm. b. d. Korr.*: Inzwischen gelang uns durch Verteilungschromatographie im Lösungsmittelgemisch III an der Celitesäule die Isolierung von kristallisierter Cymarose aus dem Zuckergemisch des permethylierten, hydrolysierten Digoxins. Herrn Prof. T. REICHSTEIN danken wir verbindlichst für die Überlassung einer Probe authentischer Cymarose.

der endständigen Digitoxose bestehen, denn die α - und β -Desgluco-lanatoside geben bei der Acetylbspaltung unter alkalischen Bedingungen das gleiche Digitoxin, Gitoxin oder Digoxin ^{2, 6, 9)}.

Tab. 1. Molekulardrehwerte ^{6, 8)}

Substanz	$[\alpha]_D$ in Pyridin	$[M]_D$	$\Delta [M]_D$
β -Acetyl-digitoxin ²⁾	+16.2°	+131°	+185°
Digitoxin	-7°	-54°	
α -Acetyl-digitoxin ²⁾	+4.8°	+38.8°	
A β -Acetyl-gitoxin	+26.9°	+221°	+198°
Gitoxin	+3°	+23°	
α -Acetyl-gitoxin	+16°	+132°	
β -Acetyl-digoxin	+33°	+272°	+186°
Digoxin	+11°	+86°	
α -Acetyl-digoxin	+22°	+181°	
Lanatosid A	+2.5°	+24°	+80°
Desacetyl-lanatosid A	-6°	-56°	
B Lanatosid B	+11°	+108°	+84°
Desacetyl-lanatosid B	+2.5°	+24°	
Lanatosid C	+16°	+158°	+83°
Desacetyl-lanatosid C	+8°	+75°	
C Acetyl-digilanidobiose	+22°	+172°	+51°
Digilanidobiose	+10°	+121°	

Eine Ringverengung der endständigen Digitoxose aus der pyranosiden in die furanoside Form erscheint daher wenig plausibel. Eine Wanderung von Acetylgruppen ist in der Zuckerchemie nicht unbekannt. So beobachteten z. B. H. O. BOUVENG, B. LINDBERG und O. THEANDER ¹⁰⁾ bei der Methylierung ⁵⁾ den Übergang von α -Methyl-2.3.4-triacetyl-glucopyranosid in α -Methyl-2.3.6-triacetyl-4-methyl-glucopyranosid. Vermutlich wird die Umlagerung der α - und β -Desgluco-lanatoside ineinander über ein cyclisches Orthoacetat ablaufen, da beide beteiligten Hydroxylgruppen die *cis*-Stellung einnehmen.

Die Bildung eines pyranosiden und furanosiden Methyl-digitoxosids, die bereits von R. C. ELDERFIELD ¹¹⁾ vermutet wurde, konnten wir inzwischen nachweisen, wenn Digitoxose bei 20° mit 0.5 *n* methanol. Salzsäure behandelt wurde. Im Gemisch III lassen sich papierchromatographisch beide Methyl-digitoxoside mit den R_F -Werten 0.65 und 0.55 gut auftrennen, von denen nur der Fleck R_F 0.65 mit Perjodat reagiert und somit der pyranosiden Form zukommt. Bei der sauren Hydrolyse wird aus beiden Digitoxosiden mit Perjodat reagierende Digitoxose (R_F 0.33) zurückgebildet.

Einen weiteren Hinweis auf eine Acetyl-Wanderung bei der Umlagerung der α - und β -Desgluco-lanatoside erbrachte die milde Hydrolyse mit 0.2 *n* HCl. Sowohl aus der

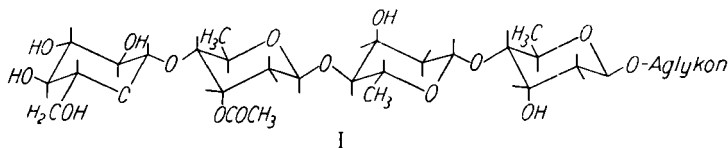
⁸⁾ A. STOLL, W. KREIS und A. v. WARTBURG, *Helv. chim. Acta* 37, 1134 [1954].

⁹⁾ A. STOLL und W. KREIS, *Helv. chim. Acta* 17, 592 [1934].

¹⁰⁾ *Acta. chem. scand.* 11, 1788 [1957].

¹¹⁾ *J. biol. Chemistry* 111, 527 [1935].

α - als auch aus der β -Form wurde das gleiche Zuckergemisch erhalten, welches neben Digitoxose (R_F 0.33) als Hauptprodukt zwei weitere Zucker mit den R_F -Werten 0.68 und 0.63 enthielt, wie die papierchromatographische Untersuchung im Lösungsmittelgemisch III zeigte. Auch das Gemisch II war für diese Auftrennung geeignet, jedoch nur, wenn der Chromatogramstreifen 12 Stdn. über dem Lösungsmittelgemisch äquilibriert wurde. Durch eine Verteilungschromatographie an der Celite-Säule mit dem Lösungsmittelgemisch III gelang die Abtrennung der Zucker 0.68 und 0.63 von der Digitoxose. Beide Substanzen, die bisher noch nicht vollständig voneinander getrennt und kristallisiert erhalten werden konnten, ergaben bei der alkalischen Behandlung mit $0.2N$ NaOH mit Perjodat reagierende Digitoxose. Für beide Zucker muß daher die Konstitution einer 3- und 4-Acetyl-digitoxose angenommen werden. Die saure Hydrolyse von Digitoxin und Digoxin, unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, zeigte lediglich die Bildung von Digitoxose.



Zur Konstitution der Zuckerseitenkette der Lanatoside (I) lassen sich noch folgende Aussagen machen: Die Verknüpfung der Digitoxose mit dem Aglykon erfolgt β -glykosidisch entsprechend der Regel nach W. KLYNE¹²⁾; das gleiche gilt für die endständige Glucose¹³⁾, wofür auch die molekularen Drehungsdifferenzen der Lanatoside und Desgluco-lanatoside sprechen.

Tab. 2. Molekulardrehwerte⁸⁾

Substanz	$[\alpha]_D$ in Pyridin	$[M]_D$	$\Delta [M]_D$
Lanatosid A	+2.5°	+24°	—14.8°
α -Acetyl-digitoxin	+4.8°	+38.8°	
Lanatosid B	+11°	+108°	—24°
α -Acetyl-gitoxin	+16°	+132°	
Lanatosid C	+16°	+158°	—23°
α -Acetyl-digoxin	+22°	+181°	
α -Methyl-glucosid	+171.9°	+334°	
β -Methyl-glucosid *)	—32.0°	—62°	

*) Pyridin/Äthanol (4:6)

Die Acetyl-digilanidobiose dürfte demnach eine 3-Acetyl-4- β -D-glucopyranosido-D-digitoxopyranose sein. Offen bleibt noch die Verknüpfung der Digitoxosen untereinander. Aus sterischen Gründen dürfte auch hier die β -glykosidische Verknüpfung die wahrscheinlichere sein, obwohl beim Vergleich der molekularen Drehungs-

¹²⁾ Biochem. J. **47**, XLI [1950].

¹³⁾ A. STOLL und J. RENZ, Enzymologia [Den Haag] **7**, 362 [1939].

differenzen der Mono- und Bis-digitoxoside der Aglykone nur eine grobe Schätzung möglich ist, wie Tab. 3 zeigt.

Tab. 3. Molekulardrehwerte

Substanz	$[\alpha]_D$ in Methanol	$[M]_D$	$\Delta [M]_D$
Digitoxigenin-	+19.1°	+71°	} —99°
-mono-digitoxosid ¹⁴⁾	—5.5°	—27.7°	
-bis-digitoxosid ¹⁴⁾	+9.2°	+57.5°	
Digitoxin	+12°	+92°	
Digitoxigenin-	+23.2°	+90.5°	} —83°
-mono-digitoxosid ¹⁵⁾	+1.4°	+7.3°	
-bis-digitoxosid ¹⁵⁾	+12.4°	+80.5°	
Digoxin	+13°	+101°	
α -Methyl-digitoxosid ¹⁶⁾	+192°	+311°	} +85°
β -Methyl-digitoxosid	—	—30° (geschätzt) ¹²⁾	
			+34°
			+73°
			+21°

Von unseren Permethylierungsversuchen bleibt noch zu erwähnen, daß eine Festlegung und somit Bestimmung der Acetylgruppe in den α - und β -Desgluco-lanatosiden nicht möglich war. Unter den alkalischen Bedingungen der Reaktion wurde die Acetylgruppe stets abgespalten und neben wenig Digitoxose als Hauptprodukt Cymarose und etwas Dimethyl-digitoxose erhalten. Wurde Digitoxose mit Methyljodid und Silberoxyd in Dimethylformamid behandelt, so erfolgte zunächst vorwiegend die Methylierung in 3-Stellung unter Bildung von Cymarose, erst unter energischeren Bedingungen wurde auch die 4-Stellung methyliert.

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT sowie dem FONDS DER CHEMIE für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Ferner sind wir Herrn Prof. A. STOLL, Basel, für die Überlassung von α - und β -Acetyl-digitoxin und der Firma P. BEIERSDORF & Co., Hamburg, für Lanatosid- und Acetyldigoxin-Gemisch zu besonderem Dank verpflichtet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die CH-Analysen wurden von Dr. A. SCHOELLER, Kronach, durchgeführt. Die Mikro-Acetylgruppen-Bestimmung nach R. F. GODDU, N. F. LEBLANC und C. M. WRIGHT¹⁷⁾ erfolgte durch Herrn Dr. GRIMMER in unserem Institut. Die angegebenen Schmelzpunkte wurden mit dem Kofler-Mikroschmelzpunktsapparat ermittelt und sind nicht korrigiert. Für die Papierchromatographie wurde das Papier Schleicher & Schüll 2043 b mgl verwendet. Die Wandungen der Chromatographierzylinder waren mit Filtrierpapier ausgekleidet, welches vom Boden des Zylinders aus mit der schweren Phase der Lösungsmittelgemische zur guten Sättigung des Chromatographieraumes versorgt wurde. Die Chromatographie erfolgte mit der leichten Phase des Gemisches absteigend, wobei in besonderen Fällen (Gemisch II) vorher 12 Stdn. äquilibriert wurde. Laufzeit der Chromatogramme: ca. 35 cm in 12 Stdn. Die Trocknung der Chromatogramme erfolgte 15 Min. bei 100°.

Gemisch I: n-Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3)

Gemisch II: Isobutylalkohol/Wasser (1:1)

Gemisch III: Isobutylalkohol/Tetrachlorkohlenstoff/Wasser (10:2:10)

¹⁴⁾ F. KAISER, Privatmitteilung.

¹⁵⁾ E. HAACK, F. KAISER und H. SPINGLER, Naturwissenschaften 44, 633 [1957].

¹⁶⁾ H. R. BOLLINGER und P. ULRICH, Helv. chim. Acta 35, 96 [1952].

¹⁷⁾ Analytic. Chem. 27, 1251 [1955].

Der Nachweis der Zucker erfolgte mit Anilin-Phthalsäure¹⁸⁾ oder besser, für Desoxyzucker geeignet, durch Einsprühen mit einer 20-proz. Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform und kurzes Erhitzen (2–4 Min.) bei 100°. Es erscheinen im Tageslicht dunkle Flecken, welche unter der UV-Lampe intensiv rot fluoreszieren.

Präparative Trennung der Hydrolysenprodukte von Lanatosid A: 4.50 g Lanatosid A wurden in 140 ccm Methanol gelöst, mit 140 ccm 0.4 *n* HCl versetzt und 30 Min. unter Rückfluß im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Zugabe von 150 ccm Wasser und Entfernung des Methanols i. Vak. bei 40° wurde nach dem Erkalten das ausgefallene Aglykon abgesaugt und das Filtrat durch 15 Min. langes Erhitzen nachhydrolysiert. Dabei schieden sich weitere Mengen Aglykon aus. Die nochmals filtrierte Lösung wurde dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt und die wäßrige, mit Amberlite IR 4 b neutralisierte Phase i. Vak. auf ca. 50 ccm eingengt. Nach Entfärbung mit Aktivkohle und Eindampfen bis zur Trockne i. Vak. hinterblieben 2.18 g noch leicht gelb gefärbtes Zuckergemisch.

Zur Auftrennung wurden 250 g Whatman-Cellulosepulver mit der schweren Phase des Lösungsmittelsystems *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3) aufgeschlämmt, die Mischung 12 Stdn. auf der Maschine geschüttelt und nach 24 Stdn. in eine Chromatographiersäule mit der gleichen Phase eingeschlämmt. Nach dem Verdrängen des Lösungsmittels durch die leichte Phase und gründlichem Nachwaschen, bis keine schwere Phase am unteren Ende der Säule mehr festzustellen war, erfolgte das Aufbringen des Zuckergemisches in möglichst wenig leichter Phase. Entwickelt wurde die Säule mit weiteren Mengen leichter Phase. Es wurden Fraktionen von je 100 ccm aufgefangen und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Jede Fraktion wurde papierchromatographisch untersucht.

Fraktion	Gewicht	Inhaltsstoff
1–7	87 mg	Acetyl-digitoxose (<i>R_F</i> 0.80)
8–9	122 mg	Digitoxose + wenig Methyl-digitoxosid
10–11	432 mg	Digitoxose
12–14	648 mg	Digitoxose + wenig Acetyl-digilanidobiose
15–16	281 mg	Acetyl-digilanidobiose + wenig Digitoxose
17–18	132 mg	Acetyl-digilanidobiose
19–20	133 mg	Acetyl-digilanidobiose + wenig Biose
21–22	110 mg	Digilanidobiose + wenig Glucose

Die Fraktionen 23–27 (154 mg) enthielten vor allem Glucose, neben Spuren von Digilanidobiose und ein unbekanntes Zuckerderivat mit dem *R_F*-Wert 0.08.

Da die Fraktionen 12–20 nicht einheitlich waren und hieraus keine kristallisierte Acetyl-digilanidobiose zu erhalten war, wurde in dem Lösungsmittelgemisch *n*-Butanol/Wasser (1:1) eine erneute Verteilungschromatographie durchgeführt. In diesem System wurden folgende *R_F*-Werte beobachtet: Digilanidobiose 0.10, Acetyl-digilanidobiose 0.23 und Digitoxose 0.50.

Fraktion	Gewicht	Inhaltsstoff
1–8	296 mg	Digitoxose
9–11	87 mg	Digitoxose + wenig Acetyl-digilanidobiose
12–19	320 mg	Acetyl-digilanidobiose
20–21	62 mg	Digilanidobiose + wenig Acetyl-biose
22–28	120 mg	Digilanidobiose

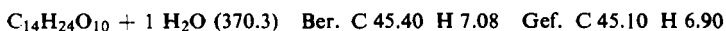
100 g Cellulosepulver wurden, wie vorstehend beschrieben, mit der schweren Phase des Lösungsmittelsystems eingeschlämmt und diese anschließend durch die leichte, mobile Phase

¹⁸⁾ S. M. PARTRIDGE, Nature [London] 164, 443 [1949].

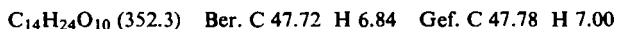
verdrängt. Die Entwicklung der Säule nach Aufbringen des Zuckergemisches (gelöst in der leichten Phase) erfolgte ebenfalls mit dieser, wobei Fraktionen von 30 ccm aufgefangen wurden.

Die Fraktionen 20–28 wurden aus Methanol/Wasser umkristallisiert und ergaben 159 mg kristallisierte Digilanidobiose vom Schmp. 211–218°, $[\alpha]_D^{20}$: +29.6° (Wasser). R_F -Wert im Gemisch I 0.25. Die 1 stdg. Hydrolyse mit 0.2 *n* HCl auf dem Wasserbad lieferte Digitoxose und Glucose (R_F -Werte im Gemisch I 0.61 und 0.18).

Acetyl-digilanidobiose: Die Fraktionen 12–19 wurden in Methanol gelöst, die Lösung mit etwas Aktivkohle behandelt und das farblose Filtrat i. Vak. zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit heißem Essigsäure-äthylester ausgezogen, etwas Ungelöstes durch Filtrieren entfernt und die Lösung stehengelassen. Es kristallisierten 150 mg zu Drusen vereinigte Nadeln vom Schmp. 135–136.5° mit beginnendem Sintern bei 111°. Nach weiterem dreimaligen Umkristallisieren aus Essigester sinterte die Verbindung bei 138° und schmolz vollständig bei 144–165°. $[\alpha]_D^{20}$: +49.7° (Wasser). Nach 12 und 36 Stdn. wurde keine Änderung der Drehwerte beobachtet.



Beim Trocknen i. Hochvak. bei 80° verlor die Substanz 1 Mol. H₂O.



Die Mikroacetylbestimmung¹⁷⁾ ergab den Wert für 1 Acetylgruppe.

Die Acetyl-digilanidobiose ist gut löslich in Wasser und Methanol/Pyridin, schwer in Aceton und Essigester, unlöslich in Äther.

Beispiel einer Permethylierung am Lanatosid A: 353 mg Lanatosid A, in 3 ccm Dimethylformamid gelöst, versetzte man bei ca. 20° mit 0.5 ccm Methyljodid und setzte 0.5 g Ag₂O in kleinen Portionen unter Rühren zu. Gelegentliches Abkühlen war bei größeren Substanzmengen erforderlich, um einen Anstieg der Temperatur über 30° zu vermeiden. Das Reaktionsgemisch wurde dann im verschlossenen Kolben auf der Schüttelmaschine oder mit dem Magnetrührer 48 Stdn. geschüttelt oder gerührt. Der abzentrifugierte Bodenkörper wurde mit 2 ccm Dimethylformamid und 2 ccm Chloroform gewaschen, die vereinigten Waschlösungen und das Überstehende mit 10-proz. Kaliumcyanidlösung versetzt, bis das ausgeschiedene Silbercyanid wieder in Lösung ging, und diese 4- bis 5 mal mit 5 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden 3 mal mit je 2 ccm Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und Chloroform und Dimethylformamid i. Vak. abdestilliert.

Der schmierige Rückstand wurde durch Chromatographie an Aluminiumoxyd gereinigt, in Methanol gelöst und das Methylderivat durch Wasser ausgefällt. Es konnte kein kristallisiertes Produkt erhalten werden. Die methylierte Substanz war noch hellgelb gefärbt, weniger löslich in Methanol als Lanatosid A und zeigte einen Schmelzpunkt bei 159–165°.

Von anderen Glykosiden wurden je 40 mg eingesetzt und zweimal 48 Stdn. mit 150 mg Silberoxyd und 0.15 ccm Methyljodid unter Rühren umgesetzt. Nach dem Abzentrifugieren des Bodenkörpers erfolgte die Aufarbeitung, wie vorstehend beschrieben.

Hydrolyse der methylierten Substanzen: 10 bis 20 mg der methylierten Verbindungen wurden, wie vorstehend beschrieben, in wäßrig-methanolischer Lösung 1:4 bis 1:5 hydrolysiert. Die saure Lösung wurde nach Zugabe der gleichen Menge Wasser i. Vak. vom Methanol befreit und 10 bis 15 Min. bei 100° nachhydrolysiert. Das Aglykon wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und die saure wäßrige Lösung nach der Neutralisation mit Amberlite IR 4b i. Vak. eingengt. War die Lösung stark gefärbt, so erfolgte eine Behandlung mit Aktivkohle in Methanol bei 60°. Der Eindampfrückstand wurde papierchromatographisch untersucht.