

Aus dem Laugenverbrauch geht hervor, dass zwei mit Alkali titrierte Gruppen, nämlich der Lactonring und ein Acetylrest, vorhanden sein müssen.

Das aus *Digitalis ferruginea* erhaltene Glykosid stimmt auch in seinem Verhalten in der Silicagelsäule mit dem Lanatosid A aus *Digitalis lanata* überein (vgl. auch Tab. 2).

Zusammenfassung.

Aus den Blättern der *Digitalis ferruginea* L. aus Kleinasien konnten die Glykoside Lanatosid A, Lanatosid B und Acetyl-digitoxin- β isoliert werden. Acetyl-digitoxin- β , das bisher nur durch Abbau aus Lanatosid A zugänglich war, ist somit als genuines Glykosid in der *Digitalis ferruginea* L. nachgewiesen worden.

Pharmazeutisch-Chemisches Laboratorium *Sandoz*, Basel.

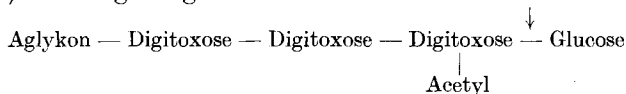
163. Acetyl-digitoxin- α und Acetyl-digitoxin- β

30. Mitteilung über Herzglykoside¹⁾

von A. Stoll und W. Kreis.

(26. IV. 52.)

Die genuinen Glykoside der *Digitalis lanata* Ehrh., die Lanatoside A, B und C, besitzen einen genau gleich aufgebauten monoacetylierten Zuckerrest, der mit den Aglykonen Digitoxigenin bzw. Gitoxigenin bzw. Digoxigenin verbunden ist²⁾. Die vier Zuckermolekeln und die Acetylgruppe sind in den Glykosiden sehr wahrscheinlich³⁾ wie folgt angeordnet:



Durch ein in den Lanatablättern mit den Glykosiden vergesellschaftetes Enzym, die sogenannte Digilanidase⁴⁾ wird die Glucose an der mit einem Pfeil bezeichneten Stelle abgespalten: es entstehen die glucosefreien Glykoside Acetyl-digitoxin, Acetyl-gitoxin und

¹⁾ 29. Mitteilung, Helv. **35**, 1310 (1952).

²⁾ A. Stoll & W. Kreis, Helv. **16**, 1049 (1933).

³⁾ Bei der sauren Hydrolyse der Lanatoside zerfällt der Zuckerrest in Digitoxose und Digilanidobiose. Die Biöse, die aus 1 Mol Digitoxose und 1 Mol Glucose besteht, kann erst nach längerer Einwirkung der Säure kristallisiert gewonnen werden, da offenbar die Acetylgruppe in der sauren Lösung nur langsam abgespalten wird. Andererseits kann bei der Hydrolyse der Desacetyl-lanatoside auch die Biöse rasch in kristallisierter Form erhalten werden. Wir schliessen aus diesem Vergleich, dass die Acetylgruppe an dem in der Biöse gebundenen äussersten Digitoxoserest haftet. Es gelang allerdings bisher nicht, eine Monoacetyl-digilanidobiose aus dem Säure-Hydrolysat der Lanatoside zu isolieren.

⁴⁾ A. Stoll, A. Hofmann & W. Kreis, Z. physiol. Ch. **235**, 249 (1935).

Acetyl-digoxin. Die Acetylglykoside¹⁾ treten in zwei isomeren Formen (α und β) auf, von denen bisher nur Acetyl-digoxin- α und Acetyl-digoxin- β rein dargestellt und charakterisiert worden sind. Sie unterscheiden sich deutlich in der Kristallform, in der Löslichkeit und vor allem in der spezifischen Drehung. Der Unterschied in den Drehwerten tritt besonders auffallend in Pyridinlösung in Erscheinung. Die Verbindung mit dem höheren Drehwert in Pyridin haben wir als β -Form bezeichnet. Von den glucosefreien Abkömmlingen der Lanatoside A und B konnten wir bisher nur die β -Formen²⁾ isolieren und beschreiben; beim Abbau von Lanatosid C konnten, wie erwähnt, beide Formen isoliert werden. Wir machten schon bei dieser Gelegenheit die Beobachtung, dass die α -Form des Acetyl-digoxins in die β -Form übergehen kann.

Inzwischen sind die beiden Acetyl-digoxine von anderer Seite auch in den Blättern der *Digitalis orientalis* L. als genuine Glykoside aufgefunden und als Digorid A (= Acetyl-digoxin- β) und Digorid B (= Acetyl-digoxin- α) bezeichnet worden³⁾. Auch bei den Präparaten aus *Digitalis orientalis* L. wurde die Umlagerung von Digorid B in Digorid A beobachtet; es scheint, dass das Digorid A die stabilere Form darstellt.

Wir haben seither die Bedingungen der Umlagerung beim Acetyl-digitoxin- β eingehender studiert und dabei reines Acetyl-digitoxin- α erhalten, das wir in der vorliegenden Arbeit erstmals beschreiben. Die Überführung der β - in die α -Form gelingt durch längeres Kochen von Lösungen in verschiedenen Solventien. Besonders geeignet sind Alkohole. Nach einiger Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Isomeren ein, dessen Lage unter den angewandten Bedingungen etwas nach der Seite der α -Form verschoben ist. Da die β -Form wesentlich schwerer löslich ist als die α -Form, so scheidet sie sich nach dem Erkalten der Reaktionslösung ziemlich einheitlich ab.

In gleicher Art gelingt es, bis zu einem Gleichgewichtszustand das α -Isomere wieder in das β -Isomere zurückzuverwandeln und die beiden Isomeren auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit zu trennen. Die Kristallform und die spezifische Drehung in Pyridin sind geeignete Kriterien für die Beurteilung der Einheitlichkeit der Präparate. In den folgenden Bildern sind die Unterschiede der Kristallformen der beiden Isomeren, wie sie sich aus verschiedenen Lösungsmittelgemischen abscheiden, erkennbar.

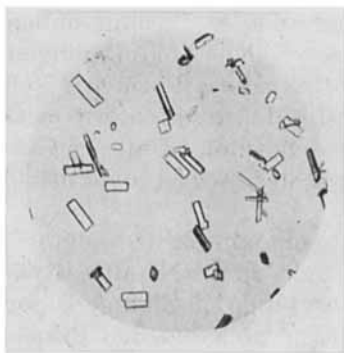
Wie die Fig. 1 zeigt, sind die Unterschiede bei der Kristallisation der beiden Isomeren aus wässrigem Methanol besonders eindrucklich. Aus Chloroform-Äther kristallisiert das α -Isomere in schönen,

¹⁾ A. Stoll & W. Kreis, *Helv.* **17**, 592 (1934).

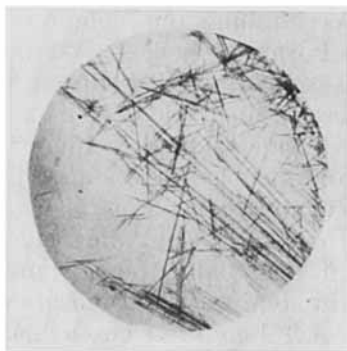
²⁾ Siehe auch die folgende Arbeit dieser Reihe über die beiden Acetyl-gitoxine.

³⁾ C. Mannich & W. Schneider, *Arch. Pharm.* **279**, 223 (1941).

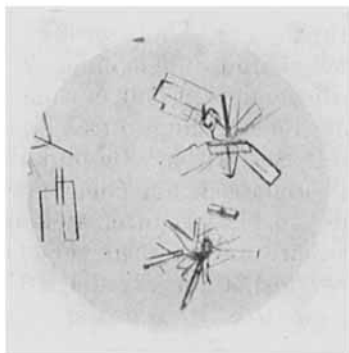
charakteristisch aneinander gelagerten Plättchen, während die β -Form in kleinen, undeutlich abgegrenzten Plättchen erscheint. Die Kristallisation der β -Form aus Chloroform-Äther ist um so weniger charakteristisch, als auch Gemische der beiden Isomeren ähnliche Kristallformen aufweisen.



α -Form aus wässer. Methanol



β -Form aus wässer. Methanol



α -Form aus Chloroform-Äther



β -Form aus Chloroform-Äther

Fig. 1.

Kristallformen von Acetyl-digitoxin- α und Acetyl-digitoxin- β .

Die Tab. 1 zeigt die wichtigsten Unterschiede in den Eigenschaften der beiden isomeren Acetyl-digitoxine.

Bei der Abspaltung der Acetylgruppe gehen beide Isomeren in Digitoxin über. Die Digitoxinpräparate aus Acetyl-digitoxin- α und aus Acetyl-digitoxin- β waren von authentischem Digitoxin, das durch enzymatischen Abbau von Purpureaglykosid A aus der *Digitalis purpurea* L. erhalten wurde, nicht zu unterscheiden. Diese Befunde machen es wahrscheinlich, dass die Isomerie der Acetyldigitoxine auf der verschiedenen Stellung der Acetylgruppe beruht, worüber wir in einer späteren Arbeit berichten werden.

Tabelle 1.

Eigenschaften von Acetyl-digitoxin- α und Acetyl-digitoxin- β .

	α -Form	β -Form
Kristallisation aus wässrigem Methanol . . .	Plättchen	lange, dünne Prismen
Schmelzpunkt	217—221°	218—240°
$[\alpha]_D^{17-22}$ { in Pyridin	+ 4,8° \pm 0,8°	+ 16,2° \pm 1,5°
{ in Methanol	+ 24,5° \pm 0,9°	+ 26,7° \pm 1,8°
Löslichkeit { in Wasser	5000—10000	ca. 200000
(1 g Substanz in cm ³ { in Methanol	16	110—140
Lösungsmittel bei 20°) { in Essigester	880	220—240
{ in Aceton	66	64
Toxizität nach <i>Hatcher</i> ¹⁾	0,447 mg	—

Experimenteller Teil.

1. Acetyl-digitoxin- β . Das für unsere Versuche benötigte Acetyl-digitoxin- β haben wir nach den Angaben der frühern Arbeit²⁾ durch enzymatischen Abbau von Lanatosid A dargestellt. Um die β -Form dieses Glykosids von der jetzt neu hergestellten α -Form deutlich abgrenzen zu können, machen wir, zum Teil in Ergänzung der frühern Beschreibung, noch die folgenden Angaben:

Das Acetyl-digitoxin- β kristallisiert aus wässrigem Methanol in Nadeln oder bei langsamer Kristallisation in dünnen, langgestreckten Prismen (Fig. 1, S. 1320). Aus Chloroform-Äther erscheinen undeutlich abgegrenzte, kleine, zu Drusen vereinigte Blättchen. Der Schmelzpunkt ist wenig charakteristisch und abhängig von der Art des Erhitzens. Bei raschem Anheizen (*Kofler*-Block) schmilzt die aus abs. Methanol kristallisierte Verbindung unter Zers. zwischen 218—240° (korr.) allmählich zusammen.

Optische Drehung in Pyridin: Der Mittelwert einer Reihe von Messungen lag bei

$$[\alpha]_D^{20} = +16,2^\circ \pm 1,5^\circ \quad (c = 1,1-1,4)$$

in Methanol: 0,1163 g Substanz in 20 cm³ Methanol; 2 dm-Rohr; $\alpha_D^{22} = +0,31^\circ \pm 0,02^\circ$.

$$[\alpha]_D^{22} = +26,7^\circ \pm 1,8^\circ$$

Bei der Bestimmung der Löslichkeit der β -Form wurden bei Zimmertemperatur folgende Werte erhalten: 1 g Substanz löste sich in 110—140 cm³ Methanol, in 64 cm³ Aceton, in 220—240 cm³ Essigester und in ca. 200000 cm³ Wasser.

Die Abspaltung der Acetylgruppe durch milde Alkalibehandlung führte, wie schon in unserer früheren Mitteilung angegeben, zu Digitoxin. Nach Kristallisation aus Methanol und Alkohol-Wasser wurde ein Präparat erhalten, von welchem 1 g bei 20° in 56 g abs. Methanol löslich war³⁾.

¹⁾ Den Wert für die α -Form, der an der Katze bestimmt wurde und sich auf 1 kg Tier bei intravenöser Infusion bezieht, verdanken wir Herrn Prof. Dr. E. Rothlin, Basel. Für die β -Form konnte wegen der Schwerlöslichkeit dieser Verbindung unter gleichen Bedingungen keine Bestimmung durchgeführt werden.

²⁾ A. Stoll & W. Kreis, *Helv.* **17**, 592 (1934). Über die Herstellung aus *Digitalis ferruginea* siehe A. Stoll & J. Renz, *Helv.* **35**, 1310 (1952).

³⁾ Die Löslichkeit des Digitoxins in Methanol ist ein gutes Kriterium für seine Reinheit. Die Löslichkeitsbestimmung wurde bei einem Überschuss an Substanz ausgeführt.

Optische Drehung des erhaltenen Digitozins: 0,2849 g Substanz in 20 cm³ Pyridin; 2 dm-Rohr, $\alpha_D^{20} = -0,21^\circ \pm 0,02^\circ$.

$$[\alpha]_D^{20} = -7,4^\circ \pm 0,8^\circ$$

2. Überführung von Acetyl-digitoxin- β in Acetyl-digitoxin- α . Eine Lösung von 2,5 g Acetyl-digitoxin- β in 250 cm³ Methanol wurde 1 Std. auf dem Dampfbad am Rückfluss gekocht und dann mit 75 cm³ Wasser versetzt. Nach einigen Std. begann die Kristallisation des unveränderten Ausgangsmaterials, die über Nacht im Kühlschrank vervollständigt wurde. Die Lösung der abfiltrierten Kristalle (1,08 g) in Methanol wurde erneut am Rückfluss gekocht und blieb nach dem Verdünnen mit Wasser im oben angegebenen Verhältnis über Nacht in der Kälte stehen, worauf 0,35 g unverändertes Ausgangsmaterial abfiltriert werden konnten. Nach erneutem Kochen mit Methanol blieben schliesslich noch 0,15 g Acetyl-digitoxin- β unverändert.

Die drei Mutterlaugen der Acetyl-digitoxin- β -Kristalle wurden vereinigt, im Vakuum eingeengt und so grösstenteils vom Methanol befreit. Die kristalline Ausscheidung wurde abfiltriert und getrocknet und wog 2,04 g. Man suspendierte sie nun als feines Pulver in 40 cm³ Aceton und liess sie unter häufigem Schütteln mehrere Std. stehen, worauf bereits ziemlich reines Acetyl-digitoxin- α (1,08 g) abfiltriert werden konnte. Die Lösung dieses Produktes in 54 cm³ Chloroform wurde mit 162 cm³ trockenem Äther versetzt. Beim Stehen über Nacht hatten sich aus dieser Lösung rechteckige, zu Kristalldrusen verwachsene Plättchen (siehe Fig. 1, S. 1320) abgeschieden, was für die reine α -Form des Acetyl-digitoxins aus Chloroform-Äther charakteristisch ist. Da fast die gesamte zur Umkristallisation eingesetzte Substanz sich einheitlich und kristall-lösungsmittelhaltig (1,09 g) wieder ausschied, so enthielt die Mutterlauge nur noch 50 mg Substanz. Eine weitere Menge von reinem Acetyl-digitoxin- α konnte indessen aus der Acetonmutterlauge nach Abfiltrieren der ersten Kristallfraktion isoliert werden. Der nach dem Eindampfen hinterbleibende Rückstand (ca. 1 g) wurde erneut in 20 cm³ Aceton suspendiert, wobei 0,24 g Substanz ungelöst blieben, die nach dem Umkristallisieren aus Chloroform-Äther 0,20 g Acetyl-digitoxin- α lieferten.

Die vereinigten Mutterlaugen aus all diesen Operationen hinterliessen beim Eindampfen ca. 0,80 g eines Präparates, das vorwiegend aus dem β -Isomeren bestand. Nach erneutem Kochen in Methanollösung und entsprechender Aufarbeitung konnten daraus noch 0,37 g der α -Form gewonnen werden.

Die beiden Acetyl-digitoxin- α -Präparate aus den Mutterlaugen (0,20 g und 0,37 g) wurden vereinigt und nochmals aus Chloroform-Äther umkristallisiert, wobei man 0,35 g eines Präparates der α -Form erhielt, das im Reinheitsgrad der Hauptfraktion (1,09 g) nicht nachstand. Sowohl aus 50-proz. Methanol wie aus Chloroform-Äther kristallisiert das α -Isomere in charakteristischen rechteckigen Plättchen, während das β -Isomere aus 70–80-proz. Methanol in Nadeln kristallisiert.

Das lufttrockene, aus Chloroform-Äther kristallisierte Acetyl-digitoxin- α verlor beim Trocknen im Hochvakuum bei 100° ca. 8–10% an Gewicht. 1 Mol Wasser wurde auch bei dieser Temperatur hartnäckig festgehalten. Beim Erhitzen einer Probe der getrockneten Substanz auf dem Kofler-Block beobachtete man bei 170–190° ein Undurchsichtigerwerden der Kristalle, dann ein teilweises Zusammensintern, und bei 217–221° (korr.) Schmelzen unter Zersetzung. Zur Analyse wurde die Substanz noch aus Aceton kristallisiert.

$C_{43}H_{66}O_{14} \cdot 1H_2O$	Ber. C 62,60	H 8,31	CH_3CO 5,22%
(824,97)	Gef. „ 62,40; 62,37	„ 8,34; 8,14	„ 5,02%

Acetyl-digitoxin- α gibt die gleiche Keller-Kiliani-Farbreaktion¹⁾ wie Digitoxin: Es bildet sich an der Grenzfläche zwischen der konz. Schwefelsäure und dem sich tiefblau färbenden Eisessig eine rein braune Zone.

Löslichkeit von Acetyl-digitoxin- α : 1 g des im Exsikkator getrockneten Glykosids löst sich bei Zimmertemperatur in 16 cm³ Methanol, in 66 cm³ Aceton, in 880 cm³ Essigester und in 5000–10000 cm³ Wasser.

¹⁾ Ausführung der Farbreaktion siehe A. Stoll & W. Kreis, Helv. **16**, 1073 (1933).

Optische Drehung: 0,2521 g im Hochvakuum bei 95° getrocknete Substanz in 20 cm³ *Pyridin*; 2 dm-Rohr; $\alpha_D^{20} = +0,12^\circ \pm 0,02^\circ$.

$$[\alpha]_D^{20} = +4,8^\circ \pm 0,8^\circ$$

0,2330 g im Hochvakuum bei 95° getrocknete Substanz in 20 cm³ *Methanol*; 2 dm-Rohr; $\alpha_D^{17} = +0,57^\circ \pm 0,02^\circ$.

$$[\alpha]_D^{17} = +24,5^\circ \pm 0,9^\circ$$

Titration mit Lauge. 0,1506 g; 0,1513 g der im Hochvakuum bei 95° getrockneten Substanz, in je 50 cm³ *Methanol* gelöst und mit je 25 cm³ 0,1-n. NaOH versetzt, verbrauchten nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur 3,69 cm³; 3,69 cm³ 0,1-n. NaOH.

C₄₃H₆₆O₁₄·1H₂O (824,97) Äquivalentgewicht: Ber. 412,5 Gef. 408,41

Zur Öffnung des Lactonrings und zur Abspaltung der Acetylgruppe sind bei der Titration 2 Mol. Lauge verbraucht worden.

3. Abbau von Acetyl-digitoxin- α zum Digitoxin. Zu einer auf ca. 10° abgekühlten Lösung von 5 g Acetyl-digitoxin- α in 600 cm³ *Methanol* wurden 600 cm³ einer ebenfalls gekühlten, wässrigen 0,2-n. Kalilauge in kleinen Portionen hinzugefügt, wodurch sich die Reaktionslösung auf ca. 20° erwärmte. Als bald begann die Kristallisation von Digitoxin, das nach 30 Min. abfiltriert, mit Wasser bis zur neutralen Reaktion nachgewaschen und getrocknet wurde (1,17 g). Das Filtrat wurde nach dem Neutralisieren mit verdünnter Salzsäure durch Abdampfen im Vakuum vom *Methanol* befreit, wobei sich der Rest des Digitoxins ausschied (2,82 g). Das Präparat aus der Mutterlauge wurde nun aus Alkohol-Wasser umkristallisiert und lieferte 2,1 g Digitoxin.

Zur weiteren Reinigung schwemmte man beide Kristallfraktionen (3,27 g) in der 10fachen Menge abs. *Methanol* auf, filtrierte nach dem Stehen über Nacht den ungelösten Anteil (2,46 g) ab und kristallisierte ihn zuerst aus Alkohol-Wasser, dann aus Essigester um. Smp. dieses reinen Digitoxinpräparates: 250–253°; Misch-Smp. mit authentischem Digitoxin ebenfalls 250–253°.

Optische Drehung: 0,2093 g Substanz in 20 cm³ *Pyridin*; 2 dm-Rohr; $\alpha_D^{20} = -0,19^\circ \pm 0,02^\circ$.

$$[\alpha]_D^{20} = -6,8^\circ \pm 0,8^\circ$$

1 g des aus Acetyl-digitoxin- α erhaltenen Digitoxinpräparates löste sich bei 21° in Gegenwart eines Überschusses an Substanz in 54 g *Methanol*. Die Löslichkeit reiner Digitoxinpräparate beträgt nach unsern Bestimmungen in *Methanol* 1:64. Die optische Drehung dieses in *Methanol* noch etwas schwerer löslichen Digitoxins zeigt indessen den gleichen Wert wie oben angegeben ist.

Sowohl aus dem α -Isomeren wie aus Acetyl-digitoxin- β durch Abspaltung der Acetylgruppe und aus dem Purpureaglykosid A der *Digitalis purpurea* durch enzymatischen Abbau erhält man identisches Digitoxin.

4. Überführung von Acetyl-digitoxin- α in Acetyl-digitoxin- β . Eine Lösung von 4 g Acetyl-digitoxin- α in 400 cm³ *Methanol* wurde nach Zugabe von 80 cm³ Wasser 1 Std. am Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen setzte allmählich eine Abscheidung von Nadeln ein, die aus der β -Form bestanden. Die Kristallisation wurde durch Aufbewahren im Kühlschrank vervollständigt, so dass schliesslich 1,20 g Acetyl-digitoxin- β abfiltriert werden konnten. Die beim Eindampfen der Mutterlauge im Vakuum hinterbleibende Substanz (2,80 g) wurde nochmals wie oben angegeben behandelt, wobei sich wiederum 0,75 g des schwerlöslichen, in Nadeln kristallisierenden β -Isomeren abschieden. Eine dritte Umlagerung des Mutterlaugenrückstandes lieferte noch 0,45 g Acetyl-digitoxin- β .

Man löste nun die vereinigten Fraktionen der β -Form (2,40 g) in 300 cm³ *Methanol* und vermischte diese Lösung mit 90 cm³ Wasser, worauf bald die charakteristische Kristallisation der β -Form einsetzte. Das nach einigen Std. abfiltrierte Präparat erwies sich in allen Eigenschaften als identisch mit dem aus Lanatosid A durch enzymatischen Abbau erhaltenen Acetyl-digitoxin- β .

Zusammenfassung.

Es werden die Eigenschaften und die gegenseitige Umwandlung der beiden Isomeren: Acetyl-digitoxin- α und Acetyl-digitoxin- β beschrieben.

Pharmazeutisch-Chemisches Laboratorium *Sandoz*, Basel.

164. Acetyl-gitoxin- α und Acetyl-gitoxin- β .

31. Mitteilung über Herzglykoside¹⁾

von A. Stoll, A. von Wartburg und W. Kreis.

(26. IV. 52.)

In der vorhergehenden Mitteilung¹⁾ haben wir über die Eigenschaften und die gegenseitige Umwandlung der beiden isomeren Acetyl-digitoxine berichtet. Eines dieser Isomeren, das Acetyl-digitoxin- β , das durch enzymatische Abspaltung der Glucose aus dem Lanatosid A erhalten werden kann, ist neuerdings auch in der *Digitalis ferruginea* als genuines Naturprodukt nachgewiesen worden²⁾. Die entsprechenden Abbauprodukte von Lanatosid C, das Acetyl-digoxin- α und das Acetyl-digoxin- β sind bereits in einer früheren Arbeit beschrieben³⁾ und seither auch als Naturprodukte (*Digorid A* und *Digorid B*) in der *Digitalis orientalis* angetroffen worden⁴⁾.

Von dem sich vom Lanatosid B ableitenden traubenzuckerfreien Glykosid, dem Acetyl-gitoxin, wurde in einer frühern Mitteilung³⁾ nur eine Form beschrieben, wobei bereits auf gewisse Schwierigkeiten bei der Reinigung der Präparate hingewiesen wurde. Das bei der enzymatischen Hydrolyse erhaltene Abbauprodukt ist auf Grund der damals vorliegenden nadelförmigen Kristalle, in Analogie zum Acetyl-digitoxin- β und zum Acetyl-digoxin- β , unter Vorbehalt der β -Reihe zugeordnet worden; der Drehwert der α -Form war uns damals noch nicht bekannt. Wir bezeichnen, wie früher schon bemerkt, Verbindungen mit dem höheren Drehwert in Pyridin als β -Formen.

Wir haben seither eine etwas grössere Menge von reinem Lanatosid B enzymatisch abgebaut und die glucosefreien Abbauprodukte eingehender untersucht, wobei es gelang, die α - und die β -Form des Acetyl-gitoxins in einheitlichem Zustand zu gewinnen und zu charakterisieren. Auf Grund unserer neuen Befunde stellen wir fest, dass wir früher in der Hauptsache die α -Form in Händen hatten, und

¹⁾ 30. Mitteilung, *Helv.* **35**, 1318 (1952).

²⁾ A. Stoll & J. Renz, *Helv.* **35**, 1310 (1952).

³⁾ A. Stoll & W. Kreis, *Helv.* **17**, 592 (1934).

⁴⁾ C. Mannich & W. Schneider, *Arch. Pharm.* **279**, 223 (1941).