

ÜBER SAPONINE DER SPIROSTANOLREIHE—IX¹

DIE KONSTITUTION DES DIGITONINS

R. TSCHESCHE und G. WULFF

Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn

(Received 8 November 1962)

Zusammenfassung—Für Digitonin wurde aufgrund der Strukturbestimmung der erstmalig isolierten Oligosaccharide Digitotetraose und Digitotriose B sowie der Ergebnisse der Methylierung die Konstitution eines $3[\beta\text{-D-Glucopyranosyl}](1 \rightarrow 3_{\text{Galakt. II}})\text{-}\beta\text{-D-galaktopyranosyl}$ (II) ($1 \rightarrow 2_{\text{Gluc. III}}\text{-}\beta\text{-D-xylopyranosyl}$ ($1 \rightarrow 3_{\text{Galakt. III}}\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}$) (III) ($1 \rightarrow 4_{\text{Galakt. IV}}\text{-}\beta\text{-D-galaktopyranosyl}$) (IV) ($1 \rightarrow 3\text{-Digitog.})] 5\alpha, 20\beta_F, 25\alpha$ Spirostan-triols ($2\alpha, 3\beta, 15\beta$) ermittelt (siehe Abb. 1).

IN DEN Samen von *Digitalis purpurea* L. findet sich etwa 2% eines mit Cholesterin fällbaren Saponingemisches, dessen Hauptbestandteil Digitonin ist. Das in diesem Glykosid enthaltene Aglykon Digitogenin ist als ein $5\alpha, 20\beta_F, 25\alpha$ -Spirostantriol ($2\alpha, 3\beta, 15\beta$) erkannt worden.² Die Untersuchung der Glykoside hat sich bisher auf eine Bestimmung der vorliegenden Zucker beschränkt, sie war vor allem dadurch erschwert, dass eine Reinigung der Saponine nicht möglich war.³ Wir haben vor kurzem berichtet,⁴ dass es über eine präparative Verteilungschromatographie im System A⁵ (Chloroform-Tetrahydrofuran-Pyridin (10:10:2), formamidgesättigt auf formamid-imprägnierter Zellulose) gelungen war, das Saponingemisch in vier Haupt- und zwei Nebensaponine zu trennen. In der Tabelle 1 sind die Mengenverhältnisse der Saponine, ihre R_G -Werte im System A sowie die Ergebnisse der Genin- und quantitativen Zuckerbestimmung angegeben.

Für das neu aufgetretene Aglykon Digalogenin konnte die Struktur eines $5\alpha, 20\beta_F, 25\alpha$ -Spirostan-diols ($3\beta, 15\beta$) bewiesen werden.⁴ Digalonin und Desglucodigitonin stellen neue Spirostanolsaponine dar, während Tigonin bereits in den Blättern von *Digitalis lanata* Ehrh. gefunden werden konnte.⁶ Die isolierten Saponine enthalten jeweils noch zu etwa 15% die entsprechenden 25β -Geninglykoside.¹ Eine Trennung der 25α - und 25β -Isomeren auf der Stufe der Glykoside ist bisher nicht möglich gewesen. Sämtliche Saponine liessen sich aus Äthanol-Wasser oder aus Methanol gut kristallisieren. Die Schmelzpunkte waren aber, wie beim Gemisch, uncharakteristisch und als Reinheitskriterien nicht geeignet, da sich der Schmelzvorgang über ein grosses Temperaturintervall (30–60°) erstreckte. Da bisher über die Art der

¹ VIII. Mitteil.: R. Tschesche, G. Wulff und G. Balle, *Tetrahedron* **18**, 959 (1962).

² Literatur hierzu siehe: L. F. Fieser und M. Fieser, *Steroide* S. 893 ff. Verlag Chemie Weinheim (1961).

³ Literatur über die Digitalis-Saponine siehe 2 und 4

⁴ R. Tschesche und G. Wulff, *Chem. Ber.* **94**, 2019 (1961).

⁵ Die Anwendung des Systems A auf die Trennung von Saponinen geht auf eine Beobachtung von Herrn Dr. H. Machleidt in unserem Institut zurück, der bei der Untersuchung von stark polaren Herzgiften fand, dass sich auch Saponine im System A gut trennen lassen.

⁶ R. Tschesche, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **69**, 1665 (1936).

Zuckerverknüpfung in den Saponinen nichts bekannt war, haben wir zunächst den Aufbau des Digitonins⁷ untersucht.

Digitonin enthält, wie schon länger bekannt ist,⁸ zwei Moll. D-Glucose, zwei Moll. D-Galaktose und ein Mol. D-Xylose. Seine Methylierung nach R. Kuhn *et al.*⁹ in Dimethylformamid mit BaO-Ba(OH)₂ und Methyljodid ergab nach üblicher Aufarbeitung⁹ kristalline 2,3,4,6-Tetramethyl- α -D-glucose, 2,3,4-Trimethyl- α -D-xylose und 4,6-Dimethyl- α -D-glucose. Ausserdem war auch Trimethylgalaktose vorhanden, die zwar in den üblichen papierchromatographischen Lösungsmittelsystemen einheitlich erschien, jedoch weder in Substanz noch als Derivat kristallisiert werden konnte.

TABELLE I. AUS DEN SAMEN VON *Digitalis purpurea* L. ISOLIERTE SAPONINE

Name	R _f -Wert ^a	Genin	Moll. Zucker	% im Saponingemisch
Digitonin	0·06	Digitogenin	2 Moll. D-Glucose 2 Moll. D-Galaktose 1 Mol. D-Xylose	40
Digalonin	0·18	Digalogenin	2 Moll. D-Glucose 2 Moll. D-Galaktose 1 Mol. D-Xylose	15
Desglu-	0·37	Digitogenin	1 Mol. D-Glucose 2 Moll. D-Galaktose 1 Mol. D-Xylose	25
digitonin				
Tigonin	0·70	Tigogenin		3
Gitonin	1·00	Gitogenin	1 Mol. D-Glucose 2 Moll. D-Galaktose 1 Mol. D-Xylose	15
Dig. d'	1·40			2

^a auf Gitonin berechnet.

Schliesslich gelang die papierchromatographische Trennung in zwei isomere Trimethylgalaktosen im Lösungsmittelsystem Benzol-Äthanol-Wasser-NH₃ (200:47:14:1¹⁰). Durch präparative Anwendung dieses Systems konnten 2,4,6-Trimethyl- α -D-galaktose und 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose (letztere als Lacton kristallisiert) getrennt und in kristalliner Form identifiziert werden. Die Struktur sämtlicher Methylzucker wurde durch Vergleich mit authentischen Verbindungen sichergestellt.

Aus dem Gemisch der Samensaponine konnte nach Methylierung ausserdem noch 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose isoliert werden, die wahrscheinlich aus Desglu-digitonin und Gitonin herrührt. Das Auftreten der 4,6-Dimethyl-D-glucose zeigte eine

⁷ Unter Digitonin sollte künftig das einheitliche Glykosid verstanden werden, während die Gemische des Handels jeweils mit dem Herkunftsnamen versehen werden können. Für die Strukturmöglichkeit wurde zunächst jede Reaktion mit der reinen Verbindung durchgeführt, während grössere Mengen an Reaktionsprodukten aus dem Saponingemisch der Samen von *Digitalis purpurea* L. gewonnen wurden. Dabei erfolgte jeweils ein gründlicher Vergleich der isolierten Verbindungen mit den aus dem reinen Glykosid erhaltenen.

⁸ R. Kuhn, H. Egge, R. Brossmer, A. Gauhe, P. Klesse, W. Lochinger, E. Röhm, H. Trischmann und D. Tschauder, *Angew. Chem.* **72**, 805 (1960).

⁹ R. Kuhn, I. Löw und H. Trischmann, *Chem. Ber.* **90**, 203 (1957).

¹⁰ H. C. Srivastava und G. A. Adams, *Canad. J. Chem.* **40**, 1415 (1962).

Verzweigung der Zuckerkette an; entsprechend wurden auch zwei endständige Zucker (D -Glucose und D -Xylose) gefunden. Die weitere Klärung der Zucker-verknüpfung musste über Bruchstücke des Zuckerteils durchgeführt werden, da es durch enzymatischen Abbau des Saponins nicht möglich war, einzelne Zucker partiell abzuspalten. Die Hydrolyse mit $0\cdot1\text{N H}_2\text{SO}_4$ ergab neben Mono- vor allem Disaccharide, von denen die β - D -Glucopyranosyl(1-4)- α - D -galaktopyranose (Lycobiose)⁹ in kristalliner Form erhalten und mit authentischem Material identifiziert werden konnte. Daneben trat die β - D -Glucopyranosyl(1-3)- D -galaktopyranose (Solabiose)¹¹ im Gemisch mit β - D -Galaktopyranosyl(1-2)- D -glucopyranose¹² auf. Die Ausbeute an höheren Oligosacchariden war aber nur gering. Es wurden daher verschiedene

TABELLE 2. AUFTRETENDE SPALTSTÜCKE DES HBr-EISESSIG-ABBAUS VON DIGITONIN

Substanz	Bausteinanordnung	R_f -Wert ^a	M_u -Wert ^b
D -Xylose	Xylose —	1·30	
D -Glucose	Glucose —	1·00	1·00
D -Galaktose	Galaktose —	0·87	
Lycobiose	Glucose — Galaktose —	0·71	0·27
Solabiose	Glucose — Galaktose —	0·62	0·59
2β - D -Galaktosido-	Galaktose — Glucose	0·62	0·45
D -glucose			
Digitriose A	Galaktose + Glucose + Xylose	0·50	
Digitriose B	Galaktose — Glucose — Galaktose —	0·45	
Digitriose C	Glucose — Galaktose — Glucose —	0·41	
Digitotetraose	Glucose — Galaktose — Glucose — Galaktose —	0·30	0·37
Digitopentaose	Glucose — Galaktose — Glucose — Galaktose —	0·16	
	Xylose		

^a R_f -Werte, auf D -Glucose bezogen, im papierchromatographischen System¹³ Essigester-Pyridin-Wasser (2:1:2; obere Phase)

^b Papier-Elektrophorese mit 0·2M Boratpuffer vom $p_H = 9$ bei 1500 V.

Methoden zur Spaltung des Digitonins in Oligosaccharide versucht, von denen der Abbau mit Bromwasserstoff-Eisessig die besten Ergebnisse erbrachte. Auch hierbei wurde jedoch die D -Xylose bevorzugt abgespalten, so dass xylosehaltige Oligosaccharide nur in sehr geringer Ausbeute entstanden. In dem erhaltenen Mono- und Oligosaccharidgemisch fanden sich die Verbindungen der Tabelle 2 vor. Dieses Gemisch wurde durch Chromatographie an Aktivkohle-Celite und durch nachfolgende präparative Verteilungschromatographie mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen sowohl an Zellulosepulver als auch an Papier aufgetrennt. In kristalliner Form erhielt man dabei neben der Lycobiose die beiden bisher unbekannten Oligosaccharide Digitotetraose und Digitriose B.

Die Digitotetraose kristallisierte aus Wasser-Methanol in kleinen Oktaedern vom Schmp. 235–236°, $[\alpha]_D^{23} +16^\circ$ (10 Min) → 18·5° (Enddrehung; in Wasser). Durch saure Hydrolyse zerfiel sie in zwei Moll. D -Glucose und zwei Moll. D -Galaktose. Die

¹¹ R. Kuhn, I. Löw und H. Trischmann, *Chem. Ber.* **88**, 1492 (1955).

¹² D. Beck und K. Wallenfels, *Liebigs Ann.* **655**, 173 (1962).

¹³ R. Kuhn, H. H. Baer und A. Gauhe, *Chem. Ber.* **89**, 2514 (1956).

Methylierung und Spaltung ergab 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 2,3,6- und 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose sowie eine Trimethyl-D-glucose, die als 3,4,6-Trimethyl- β -D-glucose identifiziert werden konnte. Damit war gesichert, dass die Digitotetraose geradkettig gebaut ist und die D-Xylose im Digitonin sich direkt am C-Atom 3 der einen D-Glucose befindet. Die Verzweigung ist also an diesem C-Atom zu suchen und ist die Ursache des Auftretens von 4,6-Dimethyl-D-glucose.

Die Hydrolyse des durch Reduktion der freien Aldehydgruppe mit NaBH₄ aus der Digitotetraose erhaltenen Digitotetraose ergab zwei Mol. D-Glucose und ein Mol. D-Galaktose, d.h. das reduzierende Ende der Kette stellt eine D-Galaktose dar. Bei Partialhydrolyse der Tetraose wurde wie beim Digitonin, vor allem Lycobiose, Solabiose und in geringer Menge 2 β -D-Galaktosido-D-glucose gebildet. Demnach besitzt die Tetraose eine alternierende Reihenfolge der Bausteine in der Form: D-Glucose-D-Galaktose-D-Glucose-D-Galaktose. Der Platz der in 3- und der in 4-Stellung verknüpften D-Galaktose innerhalb der Kette konnte in folgender Weise bewiesen werden: Der durch Reduktion der Tetraose zugängliche Digitotetraose lieferte bei der Partialhydrolyse keine Lycobiose, und unter den Methylierungs-spaltstücken fehlte die 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose. Daraus ergab sich für die Digitotetraose die Struktur einer β -D-Glucopyranosyl (I) (1-3)- β -D-galaktopyranosyl (II) (1-2)- β -D-glucopyranosyl (III) (1-4)-D-galaktopyranose (IV).^{13a} Eine Bestätigung erfuhr diese Formel durch die Beobachtung, dass Digitotetraose durch β -Glucosidase eine D-glucose abspaltete und in Digitotriose B überging. Dieses Trisaccharid konnte ebenso aus der HBr-Eisessig-Hydrolyse in schönen Nadelbüscheln vom Schmp. 212–217° erhalten werden. Weiterer Angriff der β -Glucosidase hydrolysierte Digitotriose B nicht. Mit β -Galaktosidase wurde sie zwar sehr langsam gespalten, doch liess sich kein Disaccharid sondern nur D-Galaktose und D-Glucose nachweisen. Die Methylierung und Hydrolyse der Digitotriose B ergab, wie zu erwarten war, 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose, 3,4,6-Trimethyl-D-glucose und 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose. Digitotriose B ist also β -D-Galaktopyranosyl (II) (1-2)- β -D-glucopyranosyl (III) (1-4)-D-galakto-pyranose (IV).

Die Reindarstellung der Digitotriosen A und C machte grössere Schwierigkeiten. Sie wurden durch präparative Papierchromatographie aufgetrennt. Die von allen Triosen bei der HBr-Eisessig-Spaltung in der grössten Menge gebildete Digitotriose C liess sich zwar papierchromatographisch fast einheitlich erhalten, doch kristallisierte die Substanz nicht. Bei der Methylierung wurde vor allem 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 3,4,6-Trimethyl-D-glucose und 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose gebildet, doch fanden sich daneben in geringerer Menge auch 2,3,4-Trimethyl-D-xylose, 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose, 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose und 4,6-Dimethyl-D-glucose. Bei der partiellen Hydrolyse wurde neben Monosacchariden Solabiose gebildet. Demnach stellt die Digitotriose C das Teilstück D-Glucose (I)-D-galaktose (II)-D-glucose (III) der Tetraose-Kette dar. Als Verunreinigung ist ein xylosehaltiges Oligosaccharid (wahrscheinlich Tetra-) vorhanden. Von der Digitotriose A konnten nur kleine Mengen einheitlich erhalten werden, die saure Hydrolyse ergab D-Xylose, D-Glucose und D-Galaktose.

Die Formulierung der Bindungen als β -glykosidische stützt sich auf die Isolierung von Disacchariden, für die eine β -glykosidische Bindung nachgewiesen werden konnte.

^{13a} Die hinter den Zuckern jeweils angegebenen römischen Ziffern beziehen sich auf die in gleicher Weise nummerierte Zuckerkette im Digitonin (s. Konstitutionsformel).

Neben der Lycobiose wurden durch papierchromatographischen und papierelektrophoretischen Vergleich mit authentischem Material sowie durch das Ergebnis der Methylierung β -D-Glucopyranosyl (1-3)-D-galaktopyranose (Solabiose) und β -D-Galaktopyranosyl (1-2)-D-glucopyranose nachgewiesen. Die beobachteten Drehwerte und die Spaltbarkeit durch β -Glucosidase und β -Galaktosidase sprachen ebenfalls für β -glykosidische Bindungen.

Danach ergibt sich für das Digitonin folgende Konstitution¹⁴ (Abb. 1): 3[β -D-Glucopyranosyl (I) (1 → 3_{Galakt.II})- β -D-galaktopyranosyl (II) (1 → 2_{Gluc.III})- β -D-xylopyranosyl(1 → 3_{Gluc.III})- β -D-glucopyranosyl (III) (1 → 4_{Galakt.IV})- β -D-galaktopyranosyl (IV)(1 → 3-Digitog.)] 5 α , 20 β _F, 25 α Spirostantriol (2 α , 3 β , 15 β). Digitonin hat

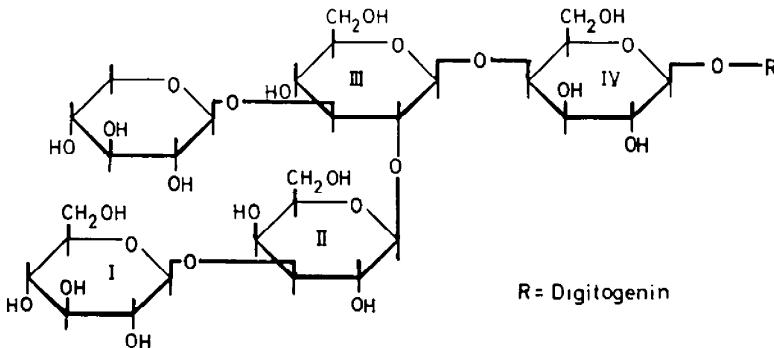


ABB. 1 Konstitution des Digitonins

damit eine ähnliche Zuckerverknüpfung wie sie von Kuhn *et al.* für eine Reihe von Alkaloid-Glykosiden (u.a. Tomatin⁹, Solanin¹¹) bestimmt wurde.

Über die Struktur der Zuckerkette der anderen Saponine aus Samen von *Digitalis purpurea* L. kann noch keine Aussage gemacht werden; wahrscheinlich hat Digalonin den gleichen Aufbau wie Digitonin, während Desglucodigitonin und Gitonin lediglich eine D-Glucose weniger enthalten.

Bei der Untersuchung der Oligosaccharide erwies es sich als notwendig, Methylzucker in kleineren Mengen aufzutrennen, um sie eindeutig identifizieren zu können. Es wurden hierfür papierchromatographische Systeme gefunden, mit denen für alle wichtigen Methylzucker der D-Glucose und D-Galaktose eine gute Trennung erreichbar war. Das System D (n-Butanol-Wasser-CCl₄ 4:4:3) ermöglichte eine gute Gruppentrennung der Methylzucker und zumeist auch eine gute Trennung innerhalb dieser Gruppen (Tab. 3).

Durch Verwendung des Systems E¹⁰ (Benzol-Äthanol-Wasser-NH₃ 200:47:14:1) konnten die im System D schwer trennbaren Methylzucker Nr. 3 und 4 sowie Nr. 9 und 10 einwandfrei aufgetrennt werden. Eine zusätzliche Trennmöglichkeit war durch die Papierelektrophorese mit Borat-Puffer gegeben, in der sich die 3,4,6-Trimethyl-d-glucose und -D-galaktose durch ihre Wanderung im elektrischen Feld von anderen Methylzuckern unterscheiden.

¹⁴ Aus Analogiegründen wurde hierbei die Bindung der D-Xylose an die D-Glucose (III) und die Bindung der D-Galaktose (IV) an das Aglykon als β -glykosidisch angenommen. Die Verknüpfung der Zuckerkette mit der 3 β OH-Gruppe des Digitogenins stützt sich ebenfalls auf Analogien. So wurden eine ganze Reihe von Saponinen isoliert, deren Genin nur eine OH-Gruppe (3 β) trägt und die ähnlichen Eigenschaften wie Digitonin aufweisen.

Ferner liess sich auf die Trennung der Methylzucker die Dünnschichtchromatographie nach Stahl¹⁵ gut anwenden (R_F -Werte s. Tab. 3). Für die Untersuchung von Fraktionen aus Trennsäulen, für die Prüfung der Vollständigkeit vorgenommener Reaktionen etc. erbrachte ihre Anwendung dank des geringen Zeitaufwandes besondere Vorteile. Ausserdem bestand hierbei die Möglichkeit, schwer anfärbbare Verunreinigungen gut erkennbar zu machen.

TABELLE 3. CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER METHYLZUCKER

Nr.	Substanz	R_o -Wert ^a System D	R_o -Wert ^b System E	R_F -Wert ^c Dünnschicht
1.	2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose	1·00	1·00	0·45
2.	2,3,4-Trimethyl-D-xylose	0·91	0·84	0·50
3.	2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose	0·74	0·78	0·33
4.	2,3,4-Trimethyl-D-glucose	0·71	0·30	0·34
5.	3,4,6-Trimethyl-D-glucose	0·60	0·28	0·27
6.	2,3,6-Trimethyl-D-glucose	0·55	0·23	0·25
7.	2,4,6-Trimethyl-D-glucose	0·48	0·21	0·23
8.	3,4,6-Trimethyl-D-galaktose	0·41		
9.	2,3,6-Trimethyl-D-galaktose	0·37	0·26	0·21
10.	2,4,6-Trimethyl-D-galaktose	0·35	0·16	0·20
11.	2,3,4-Trimethyl-D-galaktose	0·30	0·12	0·16
12.	4,6-Dimethyl-D-glucose	0·17	0·04	0·11

^a R_o -Werte, auf 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose bezogen, im System D n-Butanol-Wasser- CCl_4 4:4:3

^b R_o -Werte, auf 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose bezogen, im System E Benzol-Äthanol-Wasser- NH_3 200:47:14:1

^c R_F -Werte in der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G mit dem Fliessmittel Diisopropyl-äther-Methanol 5:1

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte wurden nach Kofler in der Anordnung nach Weygand bestimmt, die I.R.-Spektren in KBr oder Chloroform mit dem Gerät von Perkin-Elmer, Modell 221 mit Gitterprismenaustauscheinheit gemessen. Die CH-Analysen führte Herr Dr. Ing. A. Schoeller, Kronach, durch. Das Al_2O_3 (Woelm. neutral) wurde durch Sieben auf einheitliche Korngroesse gebracht (63 und 71 μ). Die für präparative Verteilungschromatographie benutzte Zellulose stammte von der Firma Schleicher & Schüll (123).

An Abkürzungen werden verwendet: Chlf = Chloroform; THF = Tetrahydrofuran; Pyr = Pyridin, MeOH = Methanol; DMF = Dimethylformamid; Bz = Benzol; i-But = Isobutanol; Sg = Segment à 24 Fraktionen des Fraktionssammlers; Lg. = Lösung.

Zur Papierchromatographie wurde das Papier von Schleicher & Schüll, 2043 b, benutzt. Die Chromatogramme wurden absteigend entwickelt. Folgende Lösungsmittelsysteme kamen zur Anwendung (Volumenverhältnisse):

System A (vgl. I.c. 4): Chlf-THF-Pyr 10:10:2, formamidgesättigt auf formimidprägniertem Papier (für Saponintrennungen).

System B (vgl. I.c. 16): Essigester-Pyr-Wasser 3,6:1:1,15 obere Phase (für Monosaccharide).

System C (vgl. I.c. 13): Essigester-Pyr-Wasser 2:1:2, obere Phase (für Oligosaccharide).

System D: n-But-Wasser- CCl_4 4:4:3. Es wurde ohne Imprägnierung oder Equilibrierung des Papiers sofort mit der schweren Phase entwickelt. Das System ergab die in Tab. 3 angegebenen R_o -Werte (auf 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose bezogen) für Methylzucker. Die Elutionsdauer für eine Laufstrecke von 30 cm betrug etwa 15 Std. Der R_F -Wert der 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose war 0·76.

¹⁵ E. Stahl, *Chemikerztg.* 82, 323 (1958).

¹⁶ P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirotta, G. Ruffini und A. Sartori, *J. Chromatogr.* 3, 343 (1960).

System E¹⁰: Bz-Äthanol-Wasser-NH₃-aq. (25%) 200:47:14:1. Auch hier wurde sofort mit der mobilen (leichten) Phase entwickelt. Die R_f -Werte sind ebenfalls in Tab. 3 angegeben. Die Elutionsdauer von 6 Std. ergab 27 cm Laufstrecke (R_f -Wert der 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose war 0·60). Bessere Trennungen für Trimethylhexosen wurden im Durchlaufversfahren erhalten (z.B. waren nach 15 Std. 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose 7·1 cm und 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose 11·5 cm gewandert).

Angefärbt wurden die Zucker im allgemeinen mit Anilinhydrogenphthalat nach Partridge,¹⁷ die Saponine mit SbCl₃ in Chlf.⁴

Die präparative Trennung auf dem Papier wurde auf Bögen von 45 × 50 cm des Papiers von Schleicher & Schüll (2043 b) durchgeführt. Pro Bogen konnten etwa 30 mg Substanz aufgetragen werden. Nach Entwickeln von Leitchromatogrammen wurden die entsprechenden Zonen ausgeschnitten und eluiert.

Zur *Dünnschichtchromatographie* vgl. l.c. 4. Für die Trennung der Methylzucker an Kieselgel-G-Schichten bewährten sich die Laufmittel Diisopropyläther-MeOH sowie Bz-Aceton und Bz-MeOH. Die Trennungen konnten durch Mehrfachentwickeln mit geringerer Polarität des Lösungsmittels sehr verbessert werden. Die angegebenen Lösungsmittelgemische eigneten sich, mit Ausnahme der diisopropylätherhaltigen, auch gut zur Übertragung auf die Kieselgel-Säule. Zur Sichtbarmachung sprühte man mit Anilinhydrogenphthalat oder Chlorsulfonsäure in Eisessig (1:2) an und erhitzte anschliessend 5 Min. auf 110°.

Die *Paperelektrophorese* wurde nach l.c. 18 durchgeführt. Man benutzte einen "Pherograph-Original-Frankfurt" nach Wieland-Pfeiderer. Als Puffer diente 0·2M Borat-Lg. von pH = 9, und die angelegte Spannung betrug 1500 V. Nach 5 Std. war die D-Glucose unter diesen Bedingungen 30 cm gewandert. Die M_d -Werte wurden auf D-Glucose berechnet, als Nulllinie diente mitaufgetragene 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose.

Isolierung der Saponine

10 g Samen von *Digitalis purpurea* L. wurden, wie für *Digitalis lanata* angegeben,¹ auf cholesterinfällbares Saponin aufgearbeitet. Die papierchromatographische Untersuchung im System A zeigte die Anwesenheit von Digitonin, Digalonin, Desglucodigitonin, wenig Tigonin, Gitonin und wenig Dig. d'. Das gewonnene Rohsaponin hatte damit, auch im Verhältnis der einzelnen Substanzen zueinander, die gleiche Zusammensetzung wie Digitonin Merck oder Digitonin Hoffmann-La Roche (s. auch l.c. 4, Anm. 18)

100 g Zellulose wurden in 600 ml Aceton mit dem Ultraturrax kurz homogenisiert und in eine Säule ($d = 4$ cm, $L = 50$ cm) eingeschlemmt. Nach dem Durchschicken von 320 ml Formamid folgte die Equilibrierung mit der mobilen Phase des Systems A (etwa 3·5 V₀ von je 175 ml). Auf diese Säule wurde 1 g Digitonin Merck in 12·5 ml mobiler Phase gebracht. Die erhaltenen Fraktionen à 40 ml wurden zunächst im Wasserstrahlvakuum eingeengt und an der Ölspülung bei 10⁻³ mm zur Trockne gebracht ($T = 50^\circ$). Die Mengen in den einzelnen Fraktionen und die Natur der darin enthaltenen Stoffe zeigt Abb. 2. Nach 7·5 l mobiler Phase eluierte man mit Aceton, das dann weitere 240 mg Digitonin enthielt.

Digitonin. Das Digitonin der Fraktionen Sg₆ 1-24 und die 240 mg der Acetonspülung wurden zweimal aus wässrigem Äthanol umkristallisiert. Es bildete lange, farblose Nadeln vom Schmp. 244-285°. ($C_{56}H_{92}O_{28}$ (1229·4) Ber. C, 54·71; H, 7·54; Gef. C, 54·45; H, 7·78%) $[\alpha]_D^{20} - 40^\circ$ (Pyr; c = 2·6)

Die Substanz war papierchromatographisch einheitlich. Nach Hydrolyse liess sich nur Digitogenin nachweisen: die quantitative Zuckerbestimmung ergab D-Galaktose:D-Glucose:D-Xylose = 2·00:2·03:0·96.

Digalonin. Aus den Fraktionen Sg₆ 12 bis Sg₆ 1 (172 mg), die neben Digalonin noch Spuren Digitonin und Desglucodigitonin enthielten, kristallisierte das Digalonin aus wässrigem Äthanol papierchromatographisch einheitlich in langen, farblosen Nadeln vom Schmp. 250-295°. Als Genin konnte nur Digalogenin nachgewiesen werden; das Zuckerverhältnis ist D-Galaktose:D-Glucose:D-Xylose = 2·00:2·30:1·09.

Desglucodigitonin. Aus den Fraktionen Sg₆ 19-23 (71 mg) konnte man durch zweimaliges Umfällen aus Äthanol-Wasser und Eindunstenlassen aus Äthanol in Drusen kristallisierendes Desglucodigitonin papierchromatographisch rein erhalten. Das Aglykon ist Digitogenin. Das Zuckerverhältnis D-Galaktose:D-Glucose:D-Xylose beträgt 2·00:0·94:0·89.

¹⁷ Partridge, *Nature, Lond.* 164, 443 (1948).

Tigonin. In den Fraktionen Sg₈–11 (20 mg) fand sich hauptsächlich Tigonin. Als Genin liess sich Tigogenin nachweisen.

Gitonin. Die Fraktionen Sg₁–14 bis Sg₂ (100 mg) enthielten Gitonin, das man durch Umfällen aus Äthanol-Wasser und Kristallisation aus MeOH in kleinen, zu kugeligen Drusen vereinigten Nadeln erhielt. Beim langsamen Eindunsten der Mutterlauge bildeten sich dünne Blättchen. Die papierchromatographisch einheitliche Substanz schmolz von 240–300°. ($C_{50}H_{88}O_{23}$ (1051·2)Ber: C, 57·24; H, 7·86; Gef: C, 57·24; H, 7·93%).

Das Aglykon ist Gitogenin, und das Zuckerverhältnis D-Galaktose:D-Glucose:D-Xylose beträgt 2·00:0·99:0·93.

Dig. d' wurde noch nicht weiter untersucht.

Zur Zuckerbestimmung hydrolysierte man in allen Fällen 5–10 mg Saponin in Dioxan-Wasser 1:1 mit 3 n HCl während 3 Std. bei 90°. Danach wurde das Dioxan abdestilliert und die Lg. zweimal mit

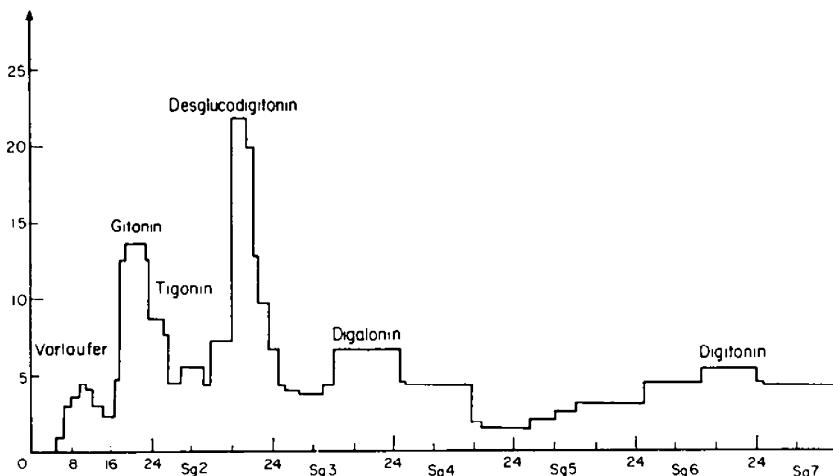


ABB. 2 Diagramm der Fraktionen der Verteilungssäule.

Ordinate: Gewicht in mg; Abszisse: Fraktionen

i-But ausgeschüttelt. Nach Neutralisieren mit Dow3 wurde eingedampft. Die quantitative Bestimmung der Zucker erfolgte nach der papierchromatographischen Trennung im System B mit der Methode von Fischer und Dörfler¹⁹ durch Photometrieren des mit Triphenyltetrazoliumchlorid gebildeten Farbstoffes. Es wurde dabei auf ein in gleicher Weise 1½ Std. säurebehandeltes Gemisch von D-Galaktose, D-Glucose und D-Xylose genau bekannter Konzentration bezogen. Bestimmt wurde jeweils das molare Verhältnis der Zucker zueinander. Die Identifizierung der Genine aus der i-But-Phase der Hydrolyse erfolgte dünnenschichtchromatographisch.

Methylierung von Digitonin

Die Methylierungen wurden nach R. Kuhn *et al.*⁸ in Dimethylformamid mit BaO–Ba(OH)₂ und Methyljodid durchgeführt. Während Glykoside nach dieser Methode ohne besondere Vorkehrungen gut methyliert werden konnten, war es schwierig, kleinere Mengen von Oligosacchariden (5–100 mg) vollständig zu methylieren. Wir haben daher den Einfluss der Qualität der Reagenzien auf das Methylierungsergebnis etwas näher untersucht. Ba(OH)₂·8H₂O und CH₃J sind sehr rein zu erhalten und haben keinen grösseren Einfluss. BaO ist jedoch sehr schwer ganz rein zu gewinnen. BaO in Brocken von der Firma Merck enthält grössere Mengen Peroxyd, während das gepulverte BaO der Firma Degussa Sulfid enthält. Mit beiden Produkten liessen sich Methylierungen durchführen, doch ist das Produkt der Degussa bequemer zu handhaben und dürfte auch nicht oxydierend wirken. Von grösserer Bedeutung für die Methylierung war die Qualität des DMF, wobei offenbar geringe Verunreinigungen, die schwer zu erkennen und zu entfernen sind, eine grosse Rolle spielen. Gute Ergebnisse ohne

¹⁸ A. B. Foster, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 12, 81 (1957).

¹⁹ F. G. Fischer und H. Dörfler, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 297, 164 (1954).

²⁰ D. J. Bell und J. Lorber, *J. Chem. Soc.*, 453 (1940).

vorherige umständliche Reinigung erzielten wir mit DMF, Uvasol E. Merck. Mit diesem Lösungsmittel war es möglich, unter strengem Feuchtigkeitsausschluss bis hinab zu 5 mg Oligosaccharid vollständig zu methylieren. Das DMF ist, vor allem über BaO, nicht sehr lange haltbar.

Je 15 mg Reindigitonin und Digitonin Merck wurden in 0·5 ml DMF (Uvasol, Merck) gelöst und mit 4 mg Ba(OH)₂·8H₂O (p.a. Merck), 100 mg BaO (gepulvert, Degussa) sowie 0·3 ml CH₃J versetzt. Unter Feuchtigkeitsausschluss wurde zunächst 14 Std. bei 20°, darauf 4 Std. bei 40° gerührt und anschliessend mit 10 ml Chlf verdünnt und filtriert. Durch fünfmaliges Waschen mit Wasser konnte das DMF weitgehend entfernt werden. Man erhitzte den Rückstand der Chlf-Lg. in 5 ml 5-proz. methanolischer HCl 6 Std. am Rückfluss, verdünnte dann mit dem gleichen Volumen H₂O und destillierte das MeOH im Vakuum bei 40° ab. Nach Absaugen der ausgefallenen Aglycone wurde die Lg. mit 5 ml 1 N HCl versetzt und 2 Std. auf 100° erhitzt. Die Säure liess sich durch Dow3 entfernen, darauf dampfte man die Lg. ein. Die Untersuchung der Methylzucker erfolgte in den papierchromatographischen Systemen D und E sowie mit Hilfe der Dünnenschichtchromatographie. Im Digitonin traten Flecken auf, die der 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 2,3,4-Trimethyl-D-xylose, 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose, 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose und der 4,6-Dimethyl-D-glucose entsprachen. Digitonin Merck zeigte zusätzlich 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose.

In einem grösseren Ansatz wurden 15 g Digitonin in 300 ml DMF mit 60 g BaO, 2·4 g Ba(OH)₂·8H₂O und 60 ml CH₃J in der oben beschriebenen Weise methyliert. Nach kurzem Anwärmen trat heftige Reaktion unter Gelbfärbung ein, so daß mit kaltem Wasser gekühlt werden musste. Nach Beendigung der heftigen Reaktion (1 Std.) wurde noch 10 Std. auf 40° erhitzt. Die Aufarbeitung ergab 16·95 g eines rötlichen, glasigen Produktes. Da diese Substanz noch eine schwache OH-Bande im I.R.-Spektrum zeigte, methylierte man sie erneut mit der halben Menge Reagenzien. Hierbei bildeten sich 17·43 g Methylierungsprodukt. Dieses wurde in 450 ml 5-proz. methanolischer HCl gelöst und die Lösung 5 Std. am Rückfluss gekocht. Nach Zusatz des gleichen Volumens Wasser und Abdestillieren des MeOH saugte man das ausgefallene Gemisch der Aglycone ab. Die wässrige Lg. wurde darauf viermal mit 300 ml Chlf extrahiert. Diese Extrakte ergaben nach Waschen und Eindampfen 6·85 g eines gelben Oeles, das die Methylglykoside der unpolareren Methylzucker enthielt. Nach Eindampfen auf die Hälfte wurde die wässrige Phase 2½ Std. auf 100° erhitzt, um die Methylglykoside zu spalten. Beim Einengen hinterblieben nach Neutralisieren mit Dow3 4·17 g eines gelben Oeles. Dieses enthielt, wie sich papier- und dünnenschichtchromatographisch zeigte, 4,6-Dimethyl-D-glucose, Trimethylgalaktose und polarere Anteile.

4,6-Dimethyl- α -D-glucose. Die Mischung wurde an 80 g Al₂O₃ (Polaritätsstufe IV) chromatographiert. Chlf mit 60% Essigester eluierte 922 mg Trimethylgalaktose, Essigester eluierte eine Mischung von Trimethylgalaktose mit Dimethylglucose (410 mg). Essigester mit 15% MeOH lieferte fast einheitliche 4,6-Dimethyl-D-glucose. Mit höheren MeOH-Gehalten im Elutionsmittel erhielt man Mischungen mit polareren Anteilen (durch unvollständige Methylierung gebildete Mono-methylzucker).

Die 933 mg der fast reinen 4,6-Dimethyl-D-glucose kristallisierten z.T. beim Stehen über Nacht. Umkristallisation aus MeOH-Essigester lieferte kleine Nadeln vom Schmp. 159–162°. (C₈H₁₆O₆ (208·2) Ber: C, 46·15; H, 7·75; Gef: C, 46·28; H, 7·72%). $[\alpha]_D^{20\cdot5} + 106^\circ$ (10 Min.) → +63·5° (Gleichgewicht) ($c = 1\cdot0$; H₂O). [Lit.⁹ Schmp.: 156–158°; $[\alpha]_D + 110^\circ \rightarrow +64^\circ$ (H₂O)].

Unsere Substanz erwies sich in allen Eigenschaften (physikalische Konstanten, R_f-Werte in verschiedenen Systemen, Mischschmelzpunkt und I.R.-Spektrum) beim direkten Vergleich als identisch mit authentischer 4,6-Dimethyl- α -D-glucose.

2,3,4-Trimethyl- α -D-xylose. Aus der Chloroformphase liess sich bei 0·2 mm Vakuum und 85–95° Badtemperatur das 2,3,4-Trimethyl-methoxylosid abdestillieren (1·55 g), $n_D^{25\cdot5} = 1\cdot4400$, (Lit.⁹ $n_D^{25} = 1\cdot4405$). Das farblose Öl wurde in 10 ml 2N HCl 3½ Std. auf 90° erhitzt und die Lg. anschliessend dreimal mit Chlf extrahiert. Nach Animpfen des eingedampften Chlf-Extraktes mit auth. 2,3,4-Trimethyl- α -D-xylose kristallisierte die Verbindung in Würfeln. Die Substanz war nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther papierchromatographisch einheitlich (sie enthielt anfangs etwas Tetramethylglucose) und schmolz nach Sintern bei 84° bei 90–92°. (C₈H₁₆O₆ (192·2) Ber: C, 49·99; H, 8·39; Gef: C, 50·03; H, 8·23%) $[\alpha]_D^{21\cdot5} + 38^\circ$ (15 Min.) → 17·6° (20 Std.) ($c = 1\cdot4$; H₂O) [Lit.²¹ Schmp.: 91–92°; $[\alpha]_D + 64^\circ \rightarrow +18^\circ$ (H₂O)].

Dieses Produkt stimmte in allen Eigenschaften mit aus D-Xylose dargestellter 2,3,6-Trimethyl- α -D-xylose überein.

²¹ R. A. Laidlaw und E. G. V. Percival, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 7, 29 (1952).

2,3,4,6-Tetramethyl- α -D-glucose. Man erhitzte den Rückstand der Destillation in 100 ml 2N HCl auf dem Wasserbad 3½ Std. bei 100°. Nach Absaugen von etwas ausgefallenem Genin wurde die wässrige Lg. dreimal mit Chlf extrahiert und anschliessend mit Dow3 neutralisiert. Beim Eindampfen des Chlf-Extraktes hinterblieben 3·1 g eines Öles und aus der wässrigen Lg. wurden 2·1 g erhalten. Der Chlf-Extrakt enthielt, wie die Papierchromatographie im System D zeigte, im wesentlichen Tetramethylglucose und in geringerer Menge Tetramethylgalaktose, Trimethylxylose und Trimethylgalaktose. Dieses Gemisch wurde durch eine präparative Verteilungssäule mit dem System D an 320 g Zellulose aufgetrennt. Man imprägnierte Zellulose mit der wässrigen Phase, während man mit der organischen Phase als mobiler Phase eluierte. Auf diese Weise konnten die Tetramethylglucose (1·1 g), die Trimethylxylose (0·3 g), die Tetramethylgalaktose (0·6 g) und die Trimethylgalaktose (0·1 g) jeweils fast rein erhalten werden. Die Tetramethylglucose und die Tetramethylgalaktose wurden durch eine präparative Chromatographie an Papierbögen mit dem gleichen System völlig rein erhalten. Die 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose kristallisierte aus Äther-Petroläther in langen Nadeln vom Schmp. 92–96°. ($C_{10}H_{20}O_6$ (236·3) Ber: C, 50·83; H, 8·53; Gef: C, 51·09; H, 8·49%) $[\alpha]_D^{25}$ 85° (20 Min.) → 82° (20 Std.) ($c = 2\cdot0$; H_2O) [Lit.²¹ Schmp. 96°; $[\alpha]_D + 92^\circ \rightarrow 84^\circ (H_2O)$].

Unsere Substanz erwies sich in allen Eigenschaften mit einer aus D-Glucose hergestellten 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose als identisch.

2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktoseanilid. Die 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose wurde bei der präparativen Papierchromatographie als Sirup erhalten. Man löste 30 mg davon in 1 ml abs. Äthanol, filtrierte und erhitzte mit 0·03 ml Anilin 2 Std. auf dem Wasserbad (90°). Nach Versetzen mit ½ ml H_2O und Animpfen liess man die Lg. stehen. Das in schönen Nadeln kristallisierende Anilid wurde noch einmal aus wässrigem Äthanol umkristallisiert. Es zeigte danach einen Schmelzpunkt von 197–198° unter Sublimation. [Lit.²² Schmp.: 194°] ($C_{16}H_{26}O_6N$ (311·4) Ber: N, 4·50; Gef: N, 4·57%).

Die Substanz war in allen Eigenschaften (R_F -Werte, I.R.-Spektrum und Mischschmelzpunkt) mit aus D-Galaktose dargestelltem 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktoseanilid identisch.

2,3,6-Trimethyl-galaktofuranolacton. Die nach der Chlf-Extraktion in der wässrigen Phase verbliebenen 2·1 g Öl enthielten neben wenig Tetramethylgalaktose und -glucose vor allem Trimethylgalaktose. Zusammen mit der schon vorher gewonnenen Trimethylgalaktose wurden 3·6 g an 400 g desaktiviertem Al_2O_3 chromatographiert, wobei man 2·1 g in dem System D papierchromatographisch einheitliche Trimethylgalaktose erhielt. Von diesem Produkt versuchte man, ein kristallines Derivat zu erhalten. Mehrere Versuche, ein Lacton oder ein Anilid kristallin zu erhalten, scheiterten. Darauf wurde die Substanz papierchromatographisch im System E in präparativem Maßstabe aufgetrennt. Man erhielt 50 mg sirupöse 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose. Sie zeigte in den papierchromatographischen Systemen D und E und in der Dünnenschicht den gleichen R_F -Wert wie auth. Substanz. Nach Lösen in 2 ml H_2O wurden 200 mg $CaCO_3$ und 0·02 ml Br_2 zugesetzt. Die Substanz reagierte nach 20 stündigem Stehen im Dunkeln nicht mehr mit Anilinphthalat unter Braunfärbung. Das $CaCO_3$ zentrifugierte man ab und wusch es zweimal mit H_2O . Die wässrige Lg. wurde mit 0·5 g Ag_2CO_3 eine Stunde geschüttelt und anschliessend filtriert. Im Filtrat liessen sich die Kationen mit Amberlite CG50/I entfernen. Beim Eindampfen der Lösung ergab sich ein farbloses Öl, das allmählich durchkristallisierte. Die Substanz konnte aus Essigester umkristallisiert werden. Schmp. 97°. [Lit.²⁴ Schmp.: 98–99°; 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose: Die ebenfalls sirupös erhaltenen 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose konnte aus Äther-Aceton kristallisiert werden. Schmp. 98–101°. ($C_8H_{18}O_6$ (222·2) Ber: C, 48·64; H, 8·16; Gef: C, 48·87; H, 7·98%) $[\alpha]_D^{25} + 86^\circ (c = 1\cdot0, H_2O)$ [Lit.¹³ Schmp.: 102°; $[\alpha]_D + 129^\circ \rightarrow +89^\circ (c = 0\cdot5 (H_2O))$.

Die so erhaltenen Trimethylgalaktose war in allen Eigenschaften mit auth. 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose identisch, der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression.

Enzymatische Spaltversuche am Saponin. Je 20 mg Digitonin Merck wurden in 20 ml H_2O gelöst und je eine Probe mit 20 mg Mandelémulsin, 50 mg Takamincellulase, 50 mg Luizym und mit 50 mg Cellulase (Bios Lab.) versetzt und mit einigen Tropfen Toluol 3 Tage bei 35° aufbewahrt. Nach Filtration extrahierte man die wässrige Lg. 3 mal mit n-But und fällte anschliessend mit 60 ml Aceton das Enzym aus. Das Filtrat wurde nach Eindampfen im System B papierchromatographisch untersucht.

²¹ J. C. Irvine und J. W. H. Oldham, *J. Chem. Soc.* 119, 1744 (1921).

²² L. Hough und J. K. N. Jones, *J. Chem. Soc.*, 1199 (1950).

²⁴ W. N. Haworth, H. Raistrick und M. Stacey, *Biochem. J.* 31, 640 (1937).

Es war vor allem mit β -Glucosidase und Luizym geringfügige Abspaltung von D-Xylose, D-Glucose und D-Galaktose eingetreten.

Partielle Säurehydrolyse des Digitonins

10 mg Digitonin wurden in 4 ml Dioxan-Wasser 1:1 (0·1N an HCl) 8 Std. am Rückfluss gekocht. Nach Abdestillieren des Dioxans liessen sich das Sapogenin und die Sapogeninglykoside mit i-But extrahieren. Die wässrige Lg. neutralisierte man mit Dow3 und dampfte sie ein. Die Untersuchung der gebildeten Oligosaccharide erfolgte papierchromatographisch im System C. Es zeigte sich, dass neben viel Xylose, Galaktose und Glucose Lycobiose und Solabiose gebildet wurden. Daneben entstanden in geringerer Menge zwei Trisaccharide und ein Tetrasaccharid.

In einem grösseren Ansatz wurden 10 g Digitonin Merck wie oben beschrieben hydrolysiert. Die Hydrolyse lieferte 5·34 g Zuckergemisch, das auf einer Zelluloseverteilungssäule mit dem zweiphasigen Lösungsmittelsystem n-But-Pyr-Wasser 3:1:3 aufgetrennt wurde. Dabei gelang es nicht, die beiden Disaccharide zu trennen, von denen 0·95 g in Mischung erhalten wurden. Die Ausbeute an höheren Oligosacchariden betrug insgesamt nur 0·2 g.

Lycobiose. Aus dem Gemisch von Lycobiose und Solabiose (Mengenverhältnis etwa 1:4) konnte durch Kristallisation aus MeOH-Wasser-n-But¹³ Lycobiose rein abgeschieden werden. Schmp. 235–236° unter Aufschäumen. Nach mehrmaliger Kristallisation betrug der Schmp. 237–240·5° ohne Aufschäumen. ($C_{12}H_{22}O_1$) (342·3) Ber: C, 42·10; H, 6·48; Gef: C, 41·97; H, 6·49%; $[\alpha]_D^{21\cdot8} + 60^\circ$ (15 Min.) → 51° (50 Min.) → 41° (15 Std.) ($c = 1\cdot0$; H₂O) [Lit.⁸ Schmp.: 246–247°; $[\alpha]_D + 62\cdot5^\circ$ (10 Min.) → 50° (60 Min.) → 41·5° (6 Std.)].

Die Substanz zeigte den gleichen R_p -Wert in verschiedenen Systemen und das gleiche I.R.-Spektrum wie auth. β -D-Glucopyranosyl(1-4)- α -D-galaktopyranose (Lycobiose). Der Mischschmelzpunkt mit auth. Substanz (235–238°) betrug 236·5–240°.

Die Hydrolyse mit β -Glucosidase (Mandeleimulsin) und mit Säure lieferte laut Papierchromatographie D-Galaktose und D-Glucose.

Durch Methylierung und nachfolgende Hydrolyse entstand 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose und 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose, wie das Papierchromatogramm zeigte. 70 mg Lycobiose wurden durch Stehenlassen bei 35° in 30 ml Pyr und 8 ml Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisierte das Octa-acetat aus Chlf-MeOH. Auf Grund des Dünnschichtchromatogramms enthielt die Substanz noch etwas α -Anomeres.²⁵ Durch zweimaliges Umkristallisieren konnte die β -Octaacetyl-lycobiose jedoch rein erhalten werden. Schmp. 193–194°. $[\alpha]_D^{21\cdot8} + 45^\circ$ ($c = 1\cdot0$; Chlf) ($C_{28}H_{38}O_{19}$) (678·3) Ber: C, 49·60; H, 5·63; Gef: C, 49·38; H, 5·58%. Der in der Literatur⁹ referierte Schmp. von 165–166° dürfte von einer Mischung aus α - und β -Octa-acetat herrühren. (R_p -Werte an Kieselgel G mit dem Laufmittel Chlf mit 20% Aceton für das α -Octa-acetat 0·36 und für das β -Octa-acetat 0·40).

HBr-Eisessig-Abbau von Peracet yldigitonin

Je 40 mg Digitonin und Digitonin Merck acetylierte man in 10 ml Pyr mit 2 ml Essigsäureanhydrid bei 35° während 24 Std. Nach Zersetzen des Essigsäureanhydrids mit Eiswasser wurde die Lg. mit Chlf ausgeschüttelt und eingedampft. Das erhaltene Acetat löste man in $\frac{1}{2}$ ml Chlf und setzte der Lösung unter guter Kühlung $\frac{1}{2}$ ml HBr-Eisessig (60 g HBr auf 100 g Eisessig) hinzu. Nach Stehen während $\frac{5}{4}$ Std. bei Zi.T. wurden unter Kühlung 75 ml Chlf zugesetzt. Aus der Lg. liess sich durch fünfmaliges Ausschütteln mit Wasser die Säure entfernen. Die Chlf-Lg. wurde daraufhin eingedampft, die Substanz in 2 ml abs. MeOH gelöst und unter guter Kühlung mit 5 ml NH₃ in MeOH (MeOH bei 0° mit NH₃ gesättigt) versetzt. Nach 20 stündigem Stehen bei Zi.T. dampfte man die Lg. bei 15° zur Trockne ein. Den Rückstand verteilte man zwischen Wasser und n-But. Die chromatographische Untersuchung des Rückstandes der Wasserphase (15 mg) im System C ergab in beiden Fällen das Vorhandensein grösserer Mengen D-Xylose, D-Galaktose, Disaccharid B und Digitotetraose sowie von kleineren Anteilen D-Glucose, Lycobiose und Digitotriose C und ferner von sehr wenig Digitotriose A, B und Digitopentaose.

²⁵ M. E. Tate und C. T. Bishop (*Canad. J. Chem.* **40**, 1043 (1962)) haben eine grössere Anzahl von Zuckeracetaten dünnschichtchromatographisch untersucht und dabei festgestellt, dass sich α - und β -Anomere gut trennen lassen und dass das β -Anomere immer einen grösseren R_p -Wert hat. Siehe auch: J. O. Deferrari, R. M. De Lederkremer, B. Matsuhiko und J. F. Sproviero, *J. Chromatogr.* **9**, 283 (1962).

Da wir feststellten, dass die R_F -Werte einzelner Oligosaccharide in Mischung etwas von denen in reiner Form differierten, wurden die aus Digitonin erhaltenen Oligosaccharide papierchromatographisch aufgetrennt. Die so erhaltenen einheitlichen Zucker Lycobiose, Disaccharid B, Digitotriose C und Digitotetraose wurden von neuem mit den aus einem größeren Ansatz Digitonin Merck (s. später) rein erhaltenen Substanzen papierchromatographisch verglichen. Auch hier zeigte sich, dass die R_F -Werte gleich waren.

In einem größeren Ansatz wurden 30 g Digitonin Merck in der oben beschriebenen Weise acetyliert, wobei man nach Versetzen mit Eiswasser das gebildete Peracetyl-digitonin absaugte (44 g). Dieses ergab nach Spaltung mit HBr-Eisessig und Verseifung der Acetate mit NH_2 in MeOH 18.3 g Rückstand in der i-But-Phase und 30.9 g in der Wasserphase. Der Rückstand der Wasserphase wurde mehrfach mit Essigester behandelt, um das gebildete Acetamid herauszulösen (6.1 g). Die übrigen 24.8 g löste man in 200 ml H_2O und kochte sie mit 30 g Aktivkohle auf. Man saugte die Aktivkohle ab und wusch die Lösung mit warmem Wasser. Darauf kochte man die Aktivkohle mehrmals mit 40-proz. Äthanol auf. Auf diese Weise wurden nach Eindampfen des äthanolischen Extraktes 4.03 g eines gelben Öles erhalten, das die Oligosaccharide stark angereichert enthielt, während im wässrigen Eluat im wesentlichen die Monosen, Acetamid sowie ein Teil der Biosen verblieben. Die 4.03 g wurden an einer Säule aus 100 g Celite und 50 g Aktivkohle nach Durso und Whistler²⁸ aufgetrennt. Man eluierte mit steigenden Mengen Äthanol (unvergällt) im Wasser.

Fraktion	ml	Proz. gehalt Äthanol im Wasser	Zucker	Gewicht in mg
1-12	3600	0	Monosen	460
13-24	3600	1	Monosen	380
25-32	2400	2	Disaccharid B	210
33-48	4800	4	Lycobiose + Disaccharid B 2:1	230
49-60	3600	6	Lycobiose + Disaccharid B 1:1	150
61-72	3600	8	Disaccharid B + Trisaccharid B	110
73-79	2100	10	Trisaccharid B + C, Disaccharid B	40
80-88	2700	15	Trisaccharid C, wenig Disaccharid B	210
89-93	1500	15	Trisaccharid C + A, wenig Disaccharid B	60
94-96	900	15	Trisaccharid A, wenig Disaccharid B	40
97-108	3600	15	Trisaccharide, Tetrasaccharid	80
109-120	3600	20	Tetrasaccharid, wenig Disaccharid B	680
121-136	4800	40	Gemisch aller mit wenig Pentasaccharid	820

Digitotetraose

Aus den Fraktionen 109-120 der Kohlesäule (680 mg) liess sich durch Lösen in MeOH-Wasser und Versetzen mit heissem n-But das Tetrasaccharid rein abscheiden. Nach nochmaligem Umfällen konnte die Digitotetraose aus Wasser-MeOH in kleinen Oktaedern erhalten werden. Schmp. 233-235° (unter Aufschäumen). ($\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$ (666.6) Ber: C, 43.24; H, 6.35; Gef: C, 43.19; H, 6.42%) $[\alpha]_D^{25} + 16^\circ$ (10 Min.) $\rightarrow 18.5^\circ$ (Gleichgewicht) ($c = 1.6$; H_2O).

Hydrolyseversuche. 10 mg Tetraose wurden in 2 ml 1N H_2SO_4 gelöst und im zugeschmolzenen Röhrchen 8 Std. auf 110° erhitzt. Papierchromatographisch zeigten sich D-Glucose und D-Galaktose im Verhältnis 1:1.

26 mg Tetraose wurden in 3 ml H_2O gelöst und mit 6 mg NaBH_4 versetzt. Nach 2 Std. zerstörte man mit Eisessig vorsichtig den Überschuss des NaBH_4 und entfernte anschliessend mit Amberlite CG50/I und Dow3 Kationen und Anionen. Nach Eindampfen wurden 10 mg Tetrat, wie bei der Tetraose angegeben ist, hydrolysiert. Es bildeten sich D-Glucose und D-Galaktose im Verhältnis 2:1.

10 mg Tetraose wurden in 10 ml H_2O gelöst und mit 5 mg β -Glucosidase (Mandelmulsin) versetzt. Nach 24 Std. bei 35° hatte sich zum kleinen Teil D-Glucose und Digitotriose B gebildet. Erst nach 7 Tagen war alles Tetrasaccharid umgesetzt. Die Digitotriose B wurde offenbar nicht weiter angegriffen.

²⁸ R. I. Whistler und D. F. Durso, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 677 (1950).

10 mg Tetraose wurden in 0.1N H₂SO₄ 1 Std. auf 100° erhitzt. Nach Entfernen der Säure mit Dow3 und Eindampfen zeigte sich im Papierchromatogramm mit System C D-Galaktose, D-Glucose, Lycobiose, Disaccharid B und unveränderte Tetraose.

10 mg Tetrait wurden ebenfalls in 0.1N H₂SO₄ partiell hydrolysiert. Im Gegensatz zur Tetraose fehlte hier die Lycobiose bei der papierchromatographischen Untersuchung.

Methylierung. 200 mg Tetraose wurden in der üblichen Weise zweimal methyliert. Die Permethyl-tetraose zeigte im I.R.-Spektrum keine OH-Bande mehr. Sie wurde im zugeschmolzenen Glasrohr in 10 ml 1N H₂SO₄ 6 Std. bei 110° hydrolysiert. Nach Neutralisation mit BaCO₃, Filtration und Eindampfen erhielt man 210 mg Methylzuckergemisch. In diesem liess sich durch Papierchromatographie 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 3,4,6-Trimethyl-D-glucose, 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose und 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose nachweisen.

Aus diesem Gemisch erhielt man die 3,4,6-Trimethyl-D-glucose im System D einheitlich durch präparative Papierchromatographie. Nach Animpfen der Äther-Pentan Lg. kristallisierte ein kleiner Teil der Substanz aus. Schmp. 94–96°, der Mischschmelzpunkt mit auth. Substanz (95–98°)²⁷ zeigte keine Depression. Die Substanz lief in allen papierchromatographischen Systemen mit auth. 3,4,6-Trimethyl-D-glucose gleich, dagegen deutlich verschieden von 2,4,6-Trimethyl-D-glucose. Im Elektropherogramm zeigte sie wie die auth. Substanz einen M_w -Wert von 0.32, während die 2,4,6-Trimethyl-D-glucose nicht wanderte.

100 mg Tetrait (dargestellt wie vorher beschrieben) wurden wie üblich methyliert. Die Substanz löste sich jedoch sehr schlecht in DMF, so dass sie im Reaktionsansatz z.T. ungelöst der Methylierung unterworfen wurde. Trotz Verlängerung der Methylierungsdauer auf 2½ Tage (davon 1½ Tage bei 40°) betrug die Ausbeute an Methylierungsprodukt nur 26 mg. Nach Hydrolyse zeigten sich im Papierchromatogramm 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 3,4,6-Trimethyl-D-glucose und 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose.

Digitotriose

Zur Trennung der Trisaccharide wurden eine ganze Reihe von Verteilungssäulen versucht, bei denen man jedoch nur die Digitotriose B rein erhalten konnte. Schliesslich wurden die Substanzen papierchromatographisch im System C aufgetrennt.

Digitotriose B. Die Fraktionen 61–72 der Kohlesäule (110 mg) wurden mit Hilfe einer Verteilungssäule des Systems n-But–DMF–Wasser 6:1:1·5¹⁸ aufgetrennt. Die reine Digitotriose B begann nach dem Eindampfen zu kristallisieren und konnte aus MeOH-Wasser-n-But in schönen Nadelbüscheln erhalten werden. Schmp. 212–217°. (C₁₈H₃₂O₁₆ (504·4) Ber: C, 42·86; H, 6·39; Gef: C, 42·82; H, 6·42%). Die Digitotriose B wurde durch Säure in eine D-Glucose und zwei D-Galaktosen gespalten. β -Glucosidase hydrolysierte die Substanz nicht. β -Galaktosidase (kristallines Präparat aus *E. coli*) spaltete die Substanz sehr langsam in D-Glucose und D-Galaktose. Ein Disaccharid als Zwischenstufe liess sich nicht fassen.

Bei partieller Säurehydrolyse konnte neben D-Glucose, D-Galaktose und Ausgangsmaterial die Lycobiose jedoch kein Disaccharid B papierchromatographisch nachgewiesen werden.

Die Methylierung von 5 mg Substanz ergab bei der papierchromatographischen Untersuchung 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose, 3,4,6-Trimethyl-D-glucose und 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose, jedoch keine 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose.

Disaccharid B

Aus den Fraktionen 25–32 der Kohlesäule wurde papierchromatographisch einheitliches Disaccharid B erhalten. Dieses Produkt liess sich jedoch nicht zur Kristallisation bringen. In fester Form konnte es durch Lösen in MeOH, Versetzen mit n-But und Abdampfen des MeOH erhalten werden. Es liess sich in dieser Form gut absaugen und aufbewahren. [α]_D²⁵ + 40° (10 Min.) → + 35° (Gleichgewicht) ($c = 1\cdot5$; H₂O). Ein kristallines Derivat darzustellen/misslang ebenfalls (Osazon, Acetat). Durch Emulsin wurde die Substanz schnell in D-Glucose und D-Galaktose im Verhältnis 1:1 gespalten. Nach Reduktion mit NaBH₄ und anschliessender Hydrolyse zeigte sich im Papierchromatogramm D-Glucose neben wenig D-Galaktose. Durch Methylierung wurden 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose und 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose erhalten, in geringer Menge auch 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose und 3,4,6-Trimethyl-D-glucose. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass neben etwa 90%

²⁷ H. B. Wood jr., R. Allerton, H. W. Diehl und H. G. Fletcher, *J. Org. Chem.* **20**, 875 (1955).

β -D-Glucopyranosyl (1-3)-D-galaktopyranose (Solabiose) noch 10% 2β -D-Galakto-D-glucose vorhanden waren.

Beim direkten papierchromatographischen Vergleich mit auth. Solabiose und auth. β -D-Galakto-*pyranosyl* (1-2)-D-glucopyranose (letztere wurde erst vor kurzem erstmalig synthetisiert¹²⁾) hatten beide Substanzen, wie auch das Disaccharid B, gleiche R_f -Werte im System B und C. Jedoch unterschieden sich die beiden Substanzen bei der Elektrophorese deutlich. M_g -Wert für Solabiose 0,59; für 2β -D-Galakto-D-glucose 0,45. Im Disaccharid B konnte man auf diese Weise neben der Hauptmenge ($M_g = 0,59$) noch eine Verunreinigung von $M_g = 0,45$ erkennen, so daß im Digitoninhydrolysat neben Solabiose auch β -D-Galakto-pyranosyl (1-2)-D-glucopyranose vorlag.

Für die Überlassung von Vergleichssubstanzen sind wir den Herren Prof. R. Kuhn (Heidelberg), Prof. D. J. Bell (Edinburgh), Prof. K. Wallenfels (Freiburg), Dr. E. G. V. Percival (Edinburgh) und Dr. H. G. Fletcher jr. (Bethesda) zu besonderem Dank verpflichtet. Ferner danken wir der Fa. E. MERCK A. G. Darmstadt, für die Überlassung einer größeren Menge Handelsdigitonin und dem Fond der Chemie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.