

Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette, XII¹⁾

Partialsynthese von Nuatigenin und Nuatigenin-3- β -D-glucopyranosid aus Diosgenin

Rudolf Tschesche* und Wolfgang Führer

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,
Gerhard-Domagk-Str. 1, D-5300 Bonn

Eingegangen am 19. Januar 1978

Diosgenin-acetat (**1**) wurde über 3 β ,16 β -Diacetoxy-26-chlor-5-cholesten-22-on (**2**) zu 3 β ,16 β -Diacetoxy-5,25-cholestadien-22-on (**3**) umgesetzt. Permanganat-Oxidation zu (25*R/S*)-3 β ,16 β -Diacetoxy-25,26-dihydroxy-5-cholesten-22-on (**4**), Verseifung, Acetylierung und Säurekatalyse ergab das 25*R/S*-Isomerengemisch des Nuatigenin-diacetats (25*R/S*-**5**). Nach Entacetylieren ließen sich die Isomeren chromatographisch trennen. Partielle Verseifung von **3** und Tritylierung ergab 16 β -Acetoxy-3 β -trityloxy-5,25-cholestadien-22-on (**3b**), das analog zu **4b** oxidiert wurde. Nach Acetylierung, Säurekatalyse und Verseifung wurde das 25*R/S*-Isomerengemisch des Nuatigenin-3-tritylethers (25*R/S*-**7**) chromatographisch getrennt. Acetylierung und Etherspaltung ergab Nuatigenin-26-acetat (**5a**), das mit Acetobromglucose und Silbersalicylat zum Glucosid **8** umgesetzt wurde.

Steroid Saponins with More than One Sugar Chain, XII¹⁾

A Partial Synthesis of Nuatigenin and Nuatigenin 3- β -D-Glucopyranoside from Diosgenin

Diosgenin acetate (**1**) was converted *via* 3 β ,16 β -diacetoxy-26-chloro-5-cholesten-22-one (**2**) into 3 β ,16 β -diacetoxy-5,25-cholestadien-22-one (**3**). Permanganate oxidation to (25*R/S*)-3 β ,16 β -diacetoxy-25,26-dihydroxy-5-cholesten-22-one (**4**), saponification, acetylation, and acid catalysis gave the C-25 isomers of nuatigenin diacetate (25*R/S*-**5**). They were separated chromatographically after de-acetylation. Partial saponification of **3** and reaction with trityl chloride resulted in 16 β -acetoxy-3 β -trityloxy-5,25-cholestadien-22-one (**3b**). Oxidation to **4b**, acetylation, acid catalysis, and saponification yielded the C-25 isomers of nuatigenin 3-trityl ether (25*R/S*-**7**). Chromatographical separation, acetylation, and cleavage of the ether gave nuatigenin 26-acetate (**5a**). By treatment of **5a** with acetobromoglucose in the presence of silver salicylate the glucoside **8** was formed.

Die Ergebnisse der pharmakologischen Voruntersuchungen an den 26-Desglucoavenosiden **A** und **B**¹⁾ und die Erwartungen, die sich an diese Verbindungen knüpften, veranlaßten uns, zum einen das Aglycon Nuatigenin²⁾ partialsynthetisch auf einfachere Weise als bisher in die Hand zu bekommen und andererseits die natürliche Zuckerkette in 3-Stellung durch nur eine Glucoseeinheit zu ersetzen. Ein derartig verkleinertes

¹⁾ XI. Mitteil.: R. Tschesche und W. Wiemann, Chem. Ber. 110, 2416 (1977).

²⁾ R. Tschesche und K. H. Richert, Tetrahedron 20, 387 (1964).

„26-Desglucoavenacosid“ könnte infolge des nahezu doppelten Gewichtsanteils an Nuatigenin eventuell verstärkte pharmakologische Wirkungen zeigen.

Synthese des Aglycons

Wir wählten als Ausgangsstufe der Synthese handelsübliches Diosgenin, denn es ist bis auf die axiale Substitution an C-25 mit Isonuatigenin²⁾, dem durch saure Katalyse entstehenden Isomerisierungsprodukt des Nuatigenins, identisch^{2, 3)}. Zum Angriff an C-25 wurde die schon länger bekannte Öffnung der Spiroacetalringe E und F mit Chlorwasserstoff in Acetanhydrid⁴⁾ zu β ,16 β -Diacetoxy-26-chlor-5-cholesten-22-on (**2**) mit anschließender Dehydrohalogenierung zu β ,16 β -Diacetoxy-5,25-cholestadien-22-on (**3**) benutzt⁵⁾.

Die nicht sehr befriedigenden Ausbeuten an **2** (maximal 23%⁵⁾) waren nicht zu steigern. Immerhin ist aber bemerkenswert, daß der nach Auskristallisieren verbliebene sirupöse und uneinheitliche Rückstand nach alkalischem Verseifen und kurzzeitigem Ansäuern beträchtliche Mengen an Diosgenin rückzugewinnen gestattet (es konnten bis zu 40% wieder auskristallisiert werden). Die anschließende Chlorwasserstoff-Abspaltung zu **3** mit Lithiumchlorid in Dimethylformamid⁶⁾ lieferte ein Produkt, das chromatographisch besser und mit höheren Ausbeuten gereinigt werden konnte als über Kristallisation.

Verbindung **3** konnte mit Kaliumpermanganat in Aceton selektiv an der 25,26-Doppelbindung der Seitenkette hydroxyliert werden, womit – abgesehen von dem C-25-Isomerengemisch – praktisch die offenkettige Form des Nuatigenins bzw. Isonuatigenins vorlag. Die in der Struktur nahe verwandten, ebenfalls aus Diosgenin hergestellten Verbindungen β -Acetoxy-5,20(22),25-furostatrien und β ,6 α -Diacetoxy-20(22),25-furostadien wurden dagegen nur im Ring E oxidiert und führten nicht zum Nuatigenin. Gleiche Selektivität zeigten Bromierungsversuche (Pufferung mit Pyridin^{7, 8)}).

Infolge der nicht fixierten Seitenkette des Cholesten-Derivates **3** fallen bei **4** die 25*R*- und 25*S*-Isomeren im Verhältnis 1:1 an. Eine chromatographische Trennung des Diastereomerengemisches erschien wenig aussichtsreich. Sie wurde auf die Stufe des Nuatigenins (**6**) verschoben.

6 kann aus **4** nicht direkt durch Verseifen der Acetate und sauren Rückschluß des Spiroacetals erhalten werden, denn der sechsgliedrige Ring F des Isonuatigenins ist unter diesen Bedingungen bevorzugt. Um die Bildung des Spiroacetals aus der Ketogruppe an C-22, der sekundären Hydroxygruppe an C-16 (β) und der tertiären an C-25 zu erzwingen, wurde **4** zunächst energisch alkalisch verseift (das 16 β -Acetat ist recht stabil!). Das entstehende Produkt braucht nicht erst isoliert zu werden. Es hat vermutlich Semiacetalstruktur (β ,22,25,26-Tetrahydroxy-5-furosten⁷⁾). Bei gleich anschließender milder Acetylierung reagieren nur die beiden reaktionsfähigen Hydroxygruppen an C-3 und C-26. Die saure Aufarbeitung dieses Reaktionsproduktes ergab dann Nuatigenin-diacetat (C-25-Isomerengemisch). Sein Massenspektrum stimmte erwartungsgemäß überein mit dem von authentischem Material⁹⁾.

³⁾ R. Tschesche und W. Schmidt, Z. Naturforsch., Teil B **21**, 896 (1966).

⁴⁾ F. C. Uhle, J. Org. Chem. **27**, 656 (1962).

⁵⁾ A. Töpfer, Dissertation, Univ. Bonn 1975.

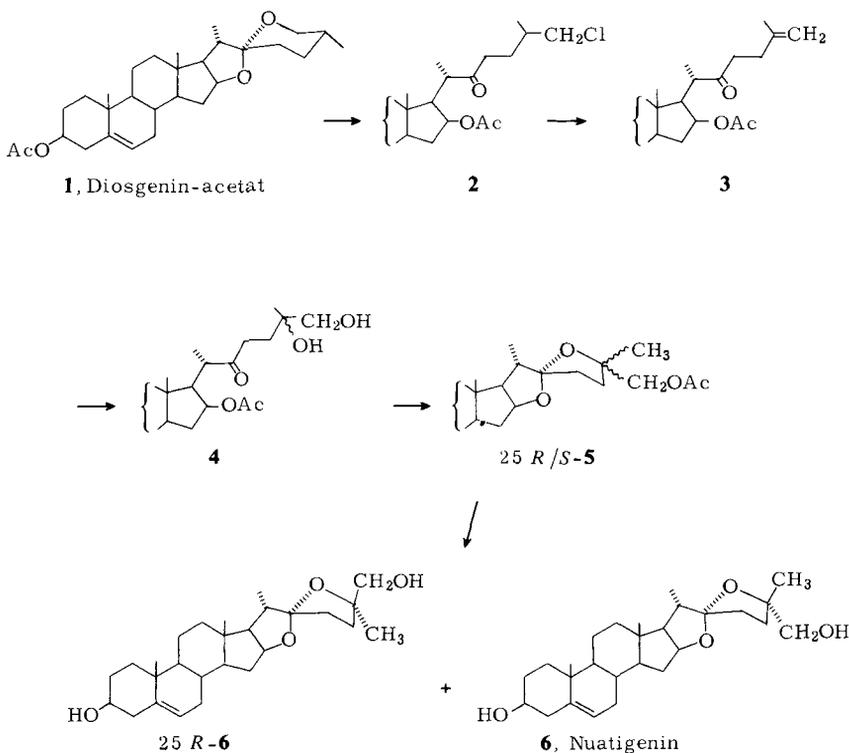
⁶⁾ R. P. Holysz, J. Am. Chem. Soc. **75**, 4432 (1953).

⁷⁾ W. Führer, Dissertation, Univ. Bonn 1978.

⁸⁾ J. Wolinsky, R. W. Novak und K. L. Erickson, J. Org. Chem. **34**, 490 (1969).

⁹⁾ R. Tschesche, M. Tauscher, H. W. Fehlhaber und G. Wulff, Chem. Ber. **102**, 2077 (1969).

Nach Entfernen der Acetatreste konnten die 25*R*- und 25*S*-Isomeren durch Chromatographie an Kieselgel isoliert werden. Die deutlichen Polaritätsunterschiede dürften durch unterschiedliche intramolekulare Wasserstoffbrücken der freien primären Hydroxygruppe an C-26 mit den Spiroacetal-Sauerstoffatomen bedingt sein. Am Molekülmodell kann unschwer erkannt werden, daß beim 25*R*-Isomeren nur am Ring F Wechselwirkung eintreten kann, während natürliches Nuatigenin die Brücke zum Ring E bildet²⁾.



Der Vergleich des auf diese Weise gewonnenen Nuatigenins mit authentischem Material fiel sowohl spektroskopisch als auch in den physikalischen Daten befriedigend aus. Das 25*R*-Isomere ist etwas polarer, schmilzt höher¹⁰⁾ und dreht etwas stärker nach links. Die Struktur des Nuatigenins²⁾ ist damit auch partialsynthetisch abgesichert.

Die ¹³C-NMR-Signale der Verbindungen 1–5 ließen sich durch Vergleich mit den Verschiebungen bei Cholesterin-acetat¹¹⁾ und Diosgenin¹²⁾, Berücksichtigung der Reaktionsfolge, Linienverdopplungen bei den Isomergemischen 4 und 5 und Zuhilfenahme der üblichen Verschiebungs- und Inkrementetabellen zuordnen (Tab. 1).

¹⁰⁾ Bei den referierten Schmelzpunkten von Nuatigenin und Isonuatigenin ist zu beachten, daß diese in früheren Veröffentlichungen^{1,3)} zum Teil versehentlich vertauscht worden sind!

¹¹⁾ H. J. Reich, M. Jautelat, M. T. Messe, F. J. Weigert und J. D. Roberts, J. Am. Chem. Soc. **91**, 7445 (1969).

¹²⁾ H. Eggert und C. Djerassi, Tetrahedron Lett. **42**, 3635 (1975).

Tab. 1. ^{13}C -Verschiebungen der Verbindungen **1**–**5**. δ -Werte, TMS interner Standard, Lösungsmittel CDCl_3 , Konzentration ca. 60 mg/ml. Die Meßwerte für **25 R-5** ergaben sich durch Vergleich mit **25 R/S-5** und **25 S-5**

| C-Atom | 1 (20 MHz) | 2 (20 MHz) | 3 (23 MHz) | 25 R/S-4 (20 MHz) | 25 R-5 (23 MHz) | 25 S-5 (23 MHz) |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 37.2 | 37.2 | 36.9 | 37.2 | 37.0 | 37.0 |
| 2 | 27.9 | 27.9 | 27.7 | 28.0 | 27.8 | 27.8 |
| 3 | 74.2 | 74.3 | 73.9 | 74.4 | 73.9 | 73.9 |
| 4 | 38.4 | 38.5 | 38.1 | 38.4 | 38.1 | 38.1 |
| 5 | 140.5 | 140.7 | 139.7 | 140.6 | 139.7 | 139.7 |
| 6 | 123.1 | 123.0 | 122.3 | 123.0 | 122.4 | 122.4 |
| 7 | 32.1 | 31.6 | 31.3 | 32.4 | 31.8 | 31.8 |
| 8 | 31.7 | 31.6 | 31.1 | 31.9 | 31.4 | 31.4 |
| 9 | 50.3 | 50.3 | 49.8 | 50.3 | 50.0 | 50.0 |
| 10 | 36.9 | 36.9 | 36.6 | 36.9 | 36.8 | 36.8 |
| 11 | 21.4 | 21.5 | 21.4 | 21.5 | 21.4 | 21.4 |
| 12 | 40.0 | 35.1 | 34.9 | 35.1 | 39.7 | 39.7 |
| 13 | 40.5 | 42.3 | 41.9 | 42.4 | 40.4 | 40.4 |
| 14 | 56.9 | 54.4 | 54.0 | 54.4 | 56.4 | 56.4 |
| 15 | 32.2 | 31.9 | 31.6 | 32.6 | 32.0 | 32.0 |
| 16 | 81.2 | 76.2 | 75.8 | 76.1 | 80.7 | 80.8 |
| 17 | 62.7 | 55.6 | 55.2 | 55.7 | 62.0 | 61.7 |
| 18 | 16.4 | 13.3 | 13.2 | 13.3 | 16.2 | 16.2 |
| 19 | 19.4 | 19.4 | 19.3 | 19.4 | 19.3 | 19.3 |
| 20 | 41.9 | 43.9 | 43.5 | 44.0 | 38.4 | 38.3 |
| 21 | 14.6 | 16.8 | 16.7 | 17.1 | 14.6 | 14.6 |
| 22 | 109.7 | 213.5 | 212.5 | 215.3 | 120.2 | 120.1 |
| 23 | 31.7 | 40.0 | 39.7 | 35.7 | 33.0 | 32.8 |
| 24 | 29.1 | 35.3 | 39.5 | 40.0 | 33.8 | 33.1 |
| 25 | 30.5 | 28.0 | 144.8 | 72.3 | 82.1 | 82.4 |
| 26 | 67.2 | 51.0 | 110.0 | 70.3 | 69.8 | 70.4 |
| 27 | 17.3 | 17.7 | 22.7 | 23.9 | 20.9 | 21.0 |
| 3-OAc | 171.1 21.0 | 171.4 21.2 | 170.5 21.1 | 171.5 21.3 | 170.5 20.8 | 170.5 20.8 |
| 16,26-OAc | – – | 170.6 20.9 | 169.8 20.7 | 170.8 21.0 | 171.0 26.0 | 171.1 23.9 |

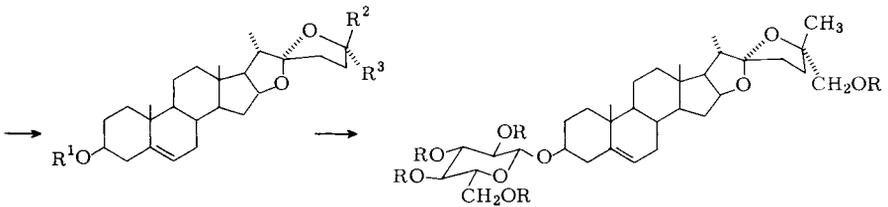
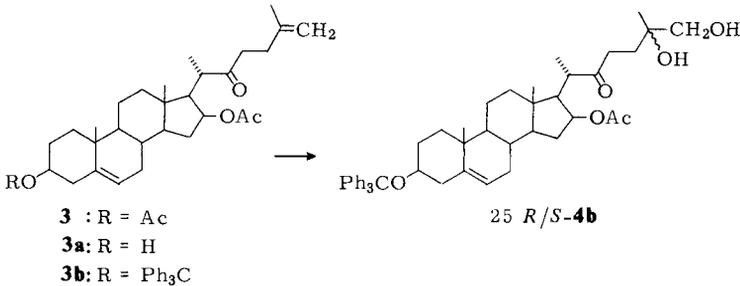
Synthese des 3-Mono-Glucosids **9**

Eine selektive Reaktion der beiden Hydroxyfunktionen des Nuatigenins gelang nicht. Damit konnte das freie bifunktionelle Aglycon nicht als Ausgangsbasis einer Glycosid-synthese benutzt werden. Der Syntheseweg wurde durch Einführung der Triphenyl-methoxygruppierung an C-3 abgewandelt.

3 wurde durch kurzzeitige alkalische Behandlung selektiv zu 16 β -Acetoxy-3 β -hydroxy-5,25-cholestadien-22-on (**3a**) verseift und dieses anschließend mit Tritylchlorid zu 16 β -Acetoxy-3 β -trityloxy-5,25-cholestadien-22-on (**3b**) umgesetzt. **3b** konnte nicht analysen-rein erhalten werden, da trotz mehrfachen Überschusses an Tritylchlorid und längerer

Reaktionsdauer kein vollständiger Umsatz eintrat und chromatographische Trennprobleme bestanden.

Deshalb wurde nur grob von nicht umgesetztem Ausgangsmaterial abgetrennt und danach mit Kaliumpermanganat in Acetonlösung oxidiert. Wie bei **3** → **4** zeigte sich ein empirisches Verhältnis von ca. 5:2 (Permanganat : **3b**) am günstigsten. Das polarere Produkt (25*R/S*)-16β-Acetoxy-25,26-dihydroxy-3β-trityloxy-5-cholesten-22-on (**4b**) ließ sich chromatographisch gut von den mitgeschleppten Verunreinigungen (in der Hauptsache Tritylalkohol) abtrennen.



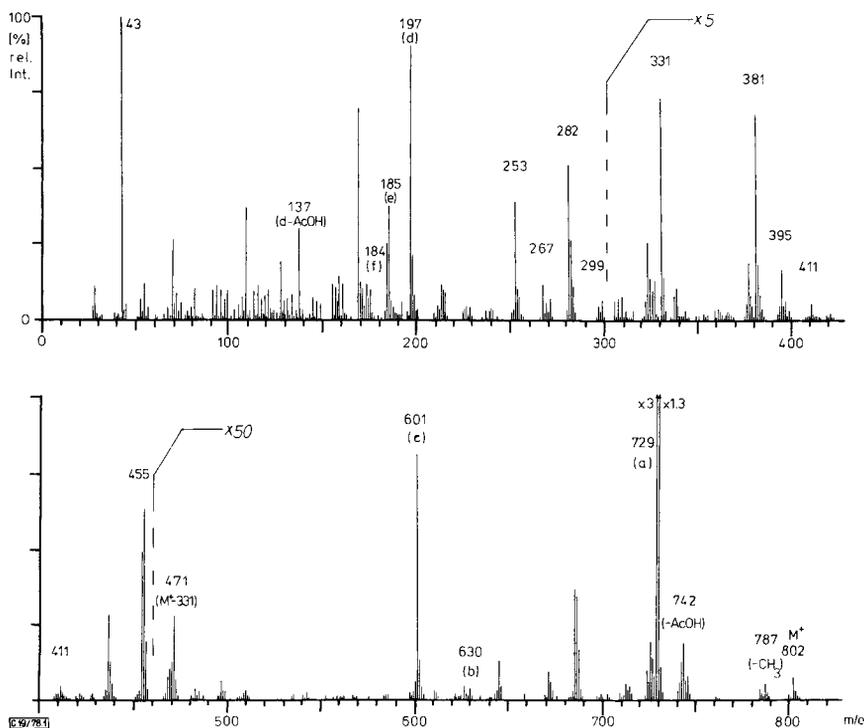
| | R ¹ | R ² | R ³ |
|---------------------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------|
| 25 <i>R/S</i> - 5b | Ph ₃ C | CH ₃ , CH ₂ OAc | |
| 7 + 25 <i>R-7</i> | Ph ₃ C | CH ₃ | CH ₂ OH |
| | | bzw. | |
| | Ph ₃ C | CH ₂ OH | CH ₃ |
| 5a | H | CH ₃ | CH ₂ OAc |

Im weiteren wurden dann in einem Arbeitsgang nacheinander das 16β-Acetat unter energischen Bedingungen abgespalten, die Position 26 durch Neucetylierung blockiert, das Produkt kurzzeitig mit Säure geschüttelt und sofort wieder alkalisiert, um den Trityl-ether nicht zu gefährden, aber das neueingeführte 26-Acetat wieder für die Isomeren-trennung zu entfernen. Es resultierte das C-25-Isomergemisch des Nuatigenin-3-trityl-ethers (**7**).

Dieses konnte noch besser als die Nuatigenin-Isomeren durch Chromatographie an Kieselgel aufgetrennt werden. Die Schmelzpunkt-, Drehwert- und Polaritätsdifferenzen waren analog. Die Massenspektren zeigten wie bei allen Nuatigenin-Derivaten die charakteristische Fragmentierung (a) bis (f) usw.^{1, 9)} unter Berücksichtigung der jeweiligen Substituenten.

Nach erneuter Acetylierung, saurer Etherspaltung und chromatographischer Entfernung des Terylalkohols erhielt man Nuatigenin-26-acetat (**5a**) als Vorstufe für die Glycosidsynthese. Es wurde mit α -Acetobromglucose in Gegenwart von Silbersalicylat¹³⁾ in modifizierter Koenigs-Knorr-Synthese umgesetzt. Die Isolierung des gewünschten Nuatigenin-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid)-26-acetats (**8**) gestaltete sich schwierig; die chromatographischen Trennprobleme ließen sich aber durch mehrere Stufen mit verschiedenen Laufmittelsystemen bewältigen.

Im Massenspektrum zeigte **8** die erwartete Nuatigenin-Fragmentierung⁹⁾: Das hochaufgelöste Molekül-Ion 802 bestätigt die Summenformel $C_{43}H_{62}O_{14}$, Abspaltung von Methyl ergab 787, von Essigsäure 742. Die Bruchstücke (a) = 729, (b) = 630, (c) = 601, (d) = 197, (e) = 185 und (f) = 184 konnten identifiziert werden. Die Fragmente 331 und 471 (= 802 - 331) wiesen auf den Zuckeranteil hin (Tetraacetylglucosylrest). Die Abspaltung noch vorhandener Substituenten ergab weitere Aufschlüsselung: 455 = 802 - 3 β -Substituent, 411 = 802 - 331 - AcOH, 395 = 455 - AcOH, 381 = (a) - 3 β -Subst., 299 = (b) - 331, 282 = (b) - Tetraacetylglucose, 267 = 282 - Methyl, 253 = (c) - Tetraacetylglucose = Ringe A bis D, 137 = (d) - AcOH.



Massenspektrum von Nuatigenin-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid)-26-acetat (**8**), aufgenommen bei 70 eV (180°C)

Das Protonenresonanzspektrum fiel erwartungsgemäß aus. Es zeigte fünf scharfe Signale im Bereich um $\delta = 2$ (Acetyl) und war im übrigen im Aglyconanteil mit **5** und **5a** vergleichbar. Ebenso

¹³⁾ G. Wulff und G. Röhle, *Angew. Chem.* **86**, 173 (1974); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **13**, 157 (1974).

wiesen die Signale der Zuckerprotonen gegenüber anderen Tetraacetylglucosiden keine Besonderheiten auf. Die β -Konfiguration des Glucosids wird durch die Vicinalkopplung von 7 Hz des C-1-Protons der Glucose bestätigt.

Das acetylfreie Glucosid **9** konnte aus **8** durch die übliche Entacetylierung^{14, 15)} erhalten werden. Es fiel allerdings nicht kristallin an, so daß eine genaue Charakterisierung auf Schwierigkeiten stieß, aber bei Verbindungen dieser Substanzklasse stellt dieses keine Besonderheit dar. Die Konstitution der Verbindung **9** als (20S,22S,25S)-22,25-Epoxy-3 β -(β -D-glucopyranosyloxy)-5-furosten-26-ol dürfte zweifelsfrei aus dem Reaktionsschema folgen; bedauerlich bleibt nur die geringe Gesamtausbeute von unter 2% aus Diosgenin.

An dieser Stelle möchten wir dem *Verband der Chemischen Industrie* für die Gewährung eines Stipendiums unseren Dank aussprechen, desgleichen dem *Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen* für die Bewilligung von Sachmitteln und der *Farbwerke Hoechst AG* für die Überlassung von Chemikalien.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Schmelzpunktkapillargerät Büchi SMP-60 und Mikroskopheiztisch nach Kofler-Weygand. — Drehwerte: Perkin-Elmer-Polarimeter 141. — NMR-Spektren: Varian EM-360, Bruker WP-80 und WH-90. — Massenspektren: MS-9, MS-30 und MS-50 (A.E.I.) im Direktteinlaßverfahren (70 eV, im allgemeinen 70–120°C), Auflösungsvermögen bei den exakten Massenbestimmungen zwischen 11 000 und 14 000. — Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Labor des Institutes ausgeführt.

Die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Merck) wurde wie üblich durchgeführt¹⁶⁾. Angefärbt wurde mit 40proz. Schwefelsäure (Erhitzen auf 150°C). Die R_F -Werte beziehen sich auf 10 cm Laufstrecke. Die präparative Schichtchromatographie erfolgte auf selbstgestrichenen Platten mit Kieselgel 60 PF₂₅₄ (Merck) in einer Dicke von ca. 5 g/dm².

Laufmittelsysteme:

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| A Cyclohexan/Aceton (10 : 3) | D Chloroform/Methanol (55 : 4) |
| B Cyclohexan/Aceton (100 : 55) | E Cyclohexan/Aceton (11 : 2) |
| C Petrolether 60–90/ (10 : 4) | F Cyclohexan/Aceton (5 : 2) |

Essigester

3 β ,16 β -Diacetoxy-26-chlor-5-cholesten-22-on (**2**) wurde mit leichten Abwandlungen der Literaturangaben⁵⁾ hergestellt: 10,0 g (22 mmol) Diosgenin-acetat/600 ml Acetanhydrid; 3 h Gaseinleitung (HCl), 3 h Rückfluß; Hydrolyse in 2 l Eiswasser. Zur Rückgewinnung von Diosgenin wurde der nach Auskristallisieren der Substanz verbliebene sirupöse Rückstand in der zehnfachen Menge einer 5proz. Lösung von Kaliumhydroxid in Ethanol 2 h unter Rückfluß erhitzt. Dann goß man in das fünffache Volumen Wasser und ließ absitzen. Schließlich wurde in warmem Ethanol aufgenommen, nach Ansäuern mit verd. Salzsäure eingengt und aus Aceton auskristallisiert. Ausb. 2,8 g **2** (24%) und 3,5 g Diosgenin (38%), daraus resultieren bei Abzug ca. 40% an **2**.

3 β ,16 β -Diacetoxy-5,25-cholestadien-22-on (**3**) wurde aus **2** durch Eliminierung gewonnen⁵⁾: 1,0 g **2** (1,9 mmol) wurde mit 1 g Lithiumchlorid (wasserfrei) in 300 ml absol. Dimethylformamid 3 Tage bei 120°C gerührt. Zur schichtchromatographischen Reinigung wurde System A benutzt.

¹⁴⁾ G. Zemplén und E. Pascu, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **62**, 1613 (1929).

¹⁵⁾ G. Wulff, G. Röhle und W. Krüger, Chem. Ber. **105**, 1097 (1972).

¹⁶⁾ R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

Einige Daten der (bekannten) Verbindungen 1–3¹⁷⁾:

| Verbindung | Molmasse | Schmp. | R _F (System A) |
|--|----------|--------|---------------------------|
| 1 C ₂₉ H ₄₄ O ₄ | 456.7 | 200 °C | 0.85 |
| 2 C ₃₁ H ₄₇ ClO ₅ | 535.2 | 212 °C | 0.54 |
| 3 C ₃₁ H ₄₆ O ₅ | 498.7 | 208 °C | 0.61 |

(25R/S)-3β,16β-Diacetoxy-25,26-dihydroxy-5-cholesten-22-on (25R/S-4): Zu 1.0 g 3 (2 mmol) in 200 ml Aceton tropfte man unter Rückfluß und Rühren während 2 h eine Lösung von 0.4 g Kaliumpermanganat (ca. 5 mmol, empirisches Verhältnis) in 40 ml Wasser und 60 ml Aceton. Nach Verschwinden der Violettfärbung (ca. 3 h) überprüfte man den Umsatz (DC), filtrierte den Niederschlag ab, der mit warmem Aceton gründlich nachgewaschen wurde, und engte die klare Lösung i. Vak. bis auf etwa 50 ml ein. Zum Aussalzen wurden 50 ml konz. Natriumchloridlösung zugesetzt. Nach viermaligem Ausschütteln mit Chloroform, Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt auf 5 Platten 20 × 20 cm im System B chromatographiert. Die Produktzone (etwa unteres Drittel) ergab nach Elution mit Aceton 0.67 g (63%). Schmp. 155–160 °C (unscharf, Isomerengemisch), R_F = 0.1 (System A).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.92 (s, CH₃-18), 1.05 (s, CH₃-19), 1.17 (s, CH₃-27), 1.20 (d, J = 7 Hz, CH₃-21), 2.06 (s, Ac-16), 2.12 (s, Ac-3), 3.49 (s, CH₂-26), 5.38 (d, J = 4 Hz, 6-H). – MS (70 eV): m/e = 532 (0.001%, M⁺), 530 (0.01%, M – 2H), 514 (4%, M – H₂O), 472 (1.5%, M – AcOH), 454 (98%, 514 – AcOH), 253 (95%, Gerüst Ringe A bis D), 43 (100%, CH₃CO⁺).

C₃₁H₄₈O₇ · H₂O (550.7) Ber. C 67.60 H 9.1 Gef. C 67.74 H 8.87

(25R/S)-Nuatigenin-diacetat (25R/S-5): 0.6 g 25R/S-4 (1.13 mmol) wurden mit der doppelten Menge Kaliumcarbonat (1.2 g) in 10 ml Wasser und 80 ml Methanol gemischt und 4 h unter Rückfluß gerührt. Nach Einengen bis zur völligen Trockenheit i. Vak. (mit Benzol) wurde der Rückstand in 15 ml Pyridin (p. a.) suspendiert und bei 0 °C mit 7 ml Acetanhydrid versetzt. Nach Stehenlassen über Nacht bei gleicher Temp. wurde in 50 ml Wasser gegossen und mit Chloroform dreimal ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wurde zweimal mit je 30 ml 5 N HCl kräftig geschüttelt, dann nach 1/2 h mit Natriumsulfat getrocknet und schließlich eingengt. Zur Isomerentrennung wurde dieses Rohprodukt eingesetzt, für analytische Zwecke wurde auf drei Platten 20 × 20 cm aufgetragen und im System B oder C chromatographiert (Produktzone im oberen Drittel). Ausb. nach Elution mit Aceton 0.46 g (80%) Isomerengemisch. Schmp. 143–149 °C (unscharf, Gemisch) aus verd. Ethanol, R_F = 0.63 (System A).

C₃₁H₄₆O₆ (514.7) Ber. C 72.34 H 9.01 Gef. C 72.57 H 8.89

Nuatigenin (6): 0.26 g 25R/S-5 (0.5 mmol) (Rohprodukt) wurden in 50 ml Methanol mit 1.2 ml 1 N KOH 30 min auf 50 °C erwärmt oder 5 h bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Ausflocken des Produktes mit Wasser wurde dieses fünfmal mit Benzol ausgeschüttelt, die Lösung auf 1 ml eingengt, auf 2 Platten 40 × 20 cm aufgetragen und im System D chromatographiert (Laufzeit ca. 8 h, Produkt oberhalb der Mitte). Elution der oberen Zone mit Aceton ergab nach Umkristallisieren des Produktes aus verd. Ethanol 90 mg (42%). Schmp. 209–211 °C¹⁰⁾, [α]_D²⁰ = –82° (0.1 Proz. in Chloroform), R_F = 0.29 (System A), 0.55 (System D).

¹H-NMR (C₅D₅N): δ = 0.84 (s, CH₃-18), 1.03 (s, CH₃-19), 1.11 (d, J = 7 Hz, CH₃-21), 1.35 (s, CH₃-27), 3.82 (s, CH₂-26), 5.4 (d, J = 4 Hz, 6-H).

C₂₇H₄₂O₄ (430.7) Ber. C 75.31 H 9.83 Gef. C 75.01 H 9.69

¹⁷⁾ Die Daten der Massen- und ¹H-NMR-Spektren von 2 und 3 sind in Lit.⁵⁾ publiziert, letztere sind in der Zuordnung der Acetatsignale (an C-3 und C-16) durch Austausch zu korrigieren ⁷⁾!

(25R)-Nuatigenin (25R-6): Die nach Verseifung von 25R/S-5 anfallende chromatographische Unterzone ergab nach Elution mit Aceton ebenfalls 90 mg (42%), Schmp. 227–228 °C (aus wäßrigem Ethanol), $[\alpha]_D^{20} = -86^\circ$ (0.1proz. in Chloroform), $R_F = 0.25$ (System A), 0.47 (System D).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): $\delta = 0.87$ (s, CH_3 -18), 1.03 (s, CH_3 -19), 1.14 (d, $J = 7$ Hz, CH_3 -21), 1.58 (s, CH_3 -27), 3.7 (s, CH_2 -26), 5.4 (d, $J = 4$ Hz, 6-H).

$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_4$ (430.7) Ber. C 75.31 H 9.83 Gef. C 75.35 H 9.79

Nuatigenin-diacetat (5): 6 wurde in der üblichen Weise wieder acetyliert (Pyridin/Acetanhydrid 2:1), nach Kristallisation aus wäßrigem Ethanol ergaben sich farblose Kristalle vom Schmp. 159–160 °C. $[\alpha]_D^{20} = -74^\circ$ (0.1proz. in Chloroform), $R_F = 0.63$ (System A).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.76$ (s, CH_3 -18), 0.95 (d, $J = 7$ Hz, CH_3 -21), 1.0 (s, CH_3 -19), 1.15 (s, CH_3 -27), 2.0 (s, Ac-3), 2.07 (s, Ac-26), 3.91 (d, $J = 11$ Hz, 26-H), 4.22 (d, $J = 11$ Hz, 26-H), 5.43 (d, $J = 4$ Hz, 6-H). – MS siehe Lit.⁹⁾ Die MS-Daten gelten auch für 25R/S-5.

$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_6$ (514.7) Ber. C 72.34 H 9.01 Gef. C 72.71 H 9.02

16 β -Acetoxy-3 β -trityloxy-5,25-cholestadien-22-on (3b): 2.0 g 3 (4 mmol) wurden in 200 ml Ethanol bei 70 °C gelöst, mit 4 ml 1 N KOH versetzt und 15 min bei dieser Temp. gerührt. Danach wurde die Lösung in 300 ml verd. Ammoniumchloridlösung gegossen und das ausfallende rohe Zwischenprodukt 16 β -Acetoxy-3 β -hydroxy-5,25-cholestadien-22-on (3a) viermal mit Chloroform ausgeschüttelt, der Extrakt über Natriumsulfat getrocknet und durch Einengen isoliert (1.74 g, 95%). Zusammen mit 3 g Chlortriphenylmethan (ca. 11 mmol, dreifacher Überschuß) wurde es in 10 ml Pyridin unter Feuchtigkeitsschluß 8 h bei 110 °C gerührt. Nach weiterem Stehenlassen über Nacht bei Raumtemp. wurden 100 ml Dichlormethan zugegeben. Mehrfaches Waschen mit Wasser, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen führten zu einem gelben Öl, das durch Säulenchromatographie (250 g Kieselgel, System E) annähernd gereinigt wurde. Ein relativ reines Produkt ließ sich erst nach mehrstufiger Chromatographie gewinnen (Platte 40 × 20 cm, System A, Elution mit Aceton, Kristallisation aus wäßrigem Ethanol). Ausb. (bei 1/10 Ansatz nach schichtchromatographischer Reinigung) etwa 70%, Rohprodukt etwa 2.5 g. $R_F = 0.74$ (System A).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.82$ (s, CH_3 -18), 0.96 (s, CH_3 -19), 1.1 (d, $J = 7$ Hz, CH_3 -21), 1.71 (s, CH_3 -27), 1.94 (s, Ac-16), 4.72 (s, CH_2 -26), 4.94 (d, $J = 4$ Hz, 6-H), 7.2–7.7 (m, Trityl-H). – MS (70 eV): $m/e = 638$ (0.3%, M – AcOH), 438 (6%, M – Tritylalkohol), 378 (9%, 438 – AcOH), 253 (7%, Gerüst Ringe A bis D), 243 (100%, Trityl-Kation).

Es gelang nicht, die Substanz analysenrein zu gewinnen, erst die nächste Stufe erbrachte akzeptable Werte.

(25R/S)-16 β -Acetoxy-25,26-dihydroxy-3 β -trityloxy-5-cholesten-22-on (25R/S-4b): 2.5 g des grob gereinigten, viskos-öligen Rohproduktes 3b (ca. 2.4 mmol) wurden in 200 ml Aceton unter Rückfluß erhitzt. Nach Zutropfen von 0.95 g Kaliumpermanganat in 40 ml Wasser und 100 ml Aceton während 2 h und Verschwinden der Permanganatfärbung wurde abfiltriert, nachdem DC völlige Umsetzung zeigte. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei 4, allerdings wurde mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Chromatographiert wurde auf 5 Platten 20 × 20 cm im System B (Laufzeit 2 h, Produkt unterhalb der Mitte, mitgeschleppter Tritylalkohol u. ä. im oberen Drittel). Elution mit Aceton führte zu 0.88 g (50%), Schmp. 112–118 °C (unscharf, Isomergemisch, Erweichung schon ab 95 °C), $R_F = 0.15$ (System A).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.84$ (s, CH_3 -18), 0.96 (s, CH_3 -19), 1.11 (s, CH_3 -27), 1.12 (d, $J = 7$ Hz, CH_3 -21), 1.97 (s, Ac-16), 3.34 (s, CH_2 -26), 4.86 (d, $J = 4$ Hz, 6-H), 7.2–7.7 (m, Trityl-H). – MS (70 eV): $m/e = 732$ (0.001%, M^+), 730 (0.01%, M – 2H), 714 (4%, M – H_2O), 672 (0.1%, M – AcOH), 654 (3%, 714 – AcOH), 472 (1.7%, M – Tritylalkohol), 253 (10%, Gerüst Ringe A bis D), 243 (100%, Trityl-Kation).

$\text{C}_{48}\text{H}_{60}\text{O}_6$ (733.0) Ber. C 78.65 H 8.25 Gef. C 78.51 H 8.32

Nuatigenin-3-tritylether (**7**): 220 mg **25 R/S-4b** (0.3 mmol) wurden mit 330 mg Natriumcarbonat, 2 ml Wasser und 40 ml Methanol 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Eindampfen zur völligen Trockenheit i. Vak., Suspendieren des Rückstandes in 5 ml Pyridin und 7.5 ml Acetanhydrid stand der Ansatz etwa 3 h bei 20°C. Nach Zusatz von 60 ml Wasser wurde dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt, diese Phase dreimal schnell mit 4 N HCl gewaschen und gleich i. Vak. eingedampft, um Etherspaltung zu vermeiden. Das auf diese Weise gewonnene Zwischenprodukt *Nuatigenin-26-acetat-3-tritylether* (**25R/S-5b**) wurde als Isomerengemisch ohne weitere Reinigung in 40 ml Methanol aufgenommen (evtl. etwas Benzolzusatz zur besseren Auflösung), mit 0.5 ml 1 N KOH versetzt und 15 min auf 50°C erwärmt. Nach Eindampfen i. Vak. und Aufnehmen in wenig Benzol wurde auf 2 Platten 20 × 20 cm im System A chromatographiert. Elution der obersten Zone mit Aceton lieferte 70 mg (35%) **7**, Schmp. 112–114°C, $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$ (0.1proz. in Chloroform), $R_F = 0.64$ (System A).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.73 (s, CH₃-18), 0.95 (s, CH₃-19), 0.97 (d, *J* = 6.5 Hz, CH₃-21), 1.16 (s, CH₃-27), 3.4 (s, CH₂-26), 4.9 (d, *J* = 4 Hz, 6-H), 7.2–7.7 (m, Trityl-H). – MS (70 eV): *m/e* = 657 (0.1%, M – CH₃), 654 (0.3%, M – H₂O), 641 (0.5%, a), 513 (0.8%, c), 413 (1.2%, M – Tritylalkohol), 282 (1%, b – Tritylalkohol), 253 (1.5%, Gerüst Ringe A bis D), 243 (100%, Tritylkation), 155 (13%, d), 143 (2%, e).

C₄₆H₅₆O₄ (673.0) Ber. C 82.10 H 8.39 Gef. C 82.49 H 8.59

(*25R*)-*Nuatigenin-3-tritylether* (**25R-7**): Elution der zweitobersten Zone der vorstehenden Chromatographie ergab ebenfalls 70 mg (35%), Schmp. 126–128°C, $[\alpha]_D^{20} = -52^\circ$ (0.1proz. in Chloroform), $R_F = 0.51$ (System A).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.75 (s, CH₃-18), 0.97 (s, CH₃-19), 1.0 (d, *J* = 6.5 Hz, CH₃-21), 1.32 (s, CH₃-27), 3.43 (s, CH₂-26), 4.9 (d, *J* = 4 Hz, 6-H), 7.2–7.7 (m, Trityl-H). – MS (70 eV): *m/e* identisch mit **7** (s. o.).

C₄₆H₅₆O₄ (673.0) Ber. C 82.10 H 8.39 Gef. C 81.30 H 8.45

Nuatigenin-26-acetat (**5a**): 70 mg **7** wurden in 2 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid 3 h stehen gelassen. Dann wurde mit 10 ml Wasser versetzt und dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Ohne Isolierung der jetzt optisch einheitlichen Verbindung **5b** wurde eingeeengt, in 30 ml Tetrahydrofuran aufgenommen, mit 2 ml konz. Salzsäure versetzt, in homogener Lösung 30 min stehen gelassen, danach mit Wasser bis zur starken Trübung verdünnt und dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach kurzem Trocknen über Natriumsulfat und Einengen wurde auf 1 Platte 20 × 20 cm im System F chromatographiert (Laufzeit 3 h, Produkt im unteren Drittel, Tritylalkohol oberhalb der Mitte). Elution mit Aceton ergab 50 mg (71%). Schmp. 168–170°C, $[\alpha]_D^{20} = -77^\circ$ (0.1proz. in Chloroform). $R_F = 0.33$ (System A), 0.56 (Cyclohexan/Aceton 10:7), 0.48 (Cyclohexan/Essigester 20:13).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.8 (s, CH₃-18), 0.96 (d, *J* = 6 Hz, CH₃-21), 1.0 (s, CH₃-19), 1.17 (s, CH₃-27), 2.1 (s, Ac-26), 3.87 (d, *J* = 11 Hz, 26-H), 4.18 (d, *J* = 11 Hz, 26-H), 5.4 (d, *J* = 4 Hz, 6-H). – MS (70 eV): *m/e* = 472 (0.7%, M⁺), 457 (0.4%, M – CH₃), 454 (1%, M – H₂O), 412 (0.6%, M – AcOH), 399 (25%, a), 300 (9%, b), 282 (10%, b – H₂O), 271 (32%, c), 253 (10%, c – H₂O), 197 (100%, d), 185 (28%, e), 184 (25%, f), 137 (39%, d – AcOH).

C₂₉H₄₄O₅ (472.7) Ber. C 73.69 H 9.38 Gef. C 73.81 H 9.22

Nuatigenin-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid)-26-acetat (**8**): 50 mg **5a** (0.11 mmol) wurden mit 200 mg α-Acetobromglucose (0.49 mmol) und 150 mg Silbersalicylat¹⁵⁾ in 1.5 ml absol. Diethylether in Suspension bei Raumtemp. unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Dann wurde abfiltriert, gründlich mit Ether und Dichlormethan nachgewaschen, ein-

geengt und mehrstufig chromatographiert: Zur Abtrennung von Tetraacetylglucose und Nebenprodukt (Orthoester an C-2 der Glucose¹⁵) auf 1 Platte 40 × 20 cm im System Cyclohexan/Essigester (20:13) (Laufzeit 8 h, Tetraacetylglucose läuft nur wenige cm, der Orthoester – 15.6 mg – liegt direkt oberhalb der Hauptzone). Danach wurde die Hauptzone (nach Elution mit Aceton) auf einer 40 × 20-cm-Platte im System Cyclohexan/Aceton (10:7) gereinigt (nicht umgesetztes **5a** liegt jetzt oberhalb **8**, Zuckerderivate unterhalb). Nach Elution mit Aceton ergab sich eine Ausb. von 30 mg (35%). Schmp. 188 – 189°C (aus Ether), $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$ (0.1proz. in Chloroform), $R_F = 0.51$ (Cyclohexan/Aceton 10:7).

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.78$ (s, CH₃-18), 0.97 (d, $J = 6.5$ Hz, CH₃-21), 1.02 (s, CH₃-19), 1.18 (s, CH₃-27), 2.03 (s, Ac), 2.05 (s, Ac), 2.08 (s, Ac), 2.10 (Ac), 2.11 (s, Ac), 3.88 (d, $J = 11$ Hz, 26-H), 4.18 (d, $J = 11$ Hz, 26-H), 5.2 (d, $J = 7$ Hz, 1-H-Glucose), 5.4 (d, $J = 4$ Hz, 6-H). – MS (70 eV): $m/e = 802$ (0.1%, M⁺), 787 (0.07%, M – CH₃), 742 (0.3%, M – AcOH), 729 (6%, a), 630 (0.01%, b), 601 (1.6%, c), 471 (0.5%, M – Tetraacetylglucosyl), 455 (13%, M – Tetraacetylglucose), 411 (1%, 471 – AcOH), 395 (3%, 455 – AcOH), 381 (14%, a – Tetraacetylglucose), 331 (19%, Tetraacetylglucosylrest), 299 (5%, b – 331), 282 (50%, b – Tetraacetylglucose), 267 (12%, 282 – CH₃), 253 (22%, Gerüst Ringe A bis D), 197 (90%, d), 185 (30%, e), 184 (18%, f), 137 (25%, d – AcOH), 43 (100%, CH₃CO⁺).

C₄₃H₆₂O₁₄ (803.0) Ber. C 64.32 H 7.78 Gef. C 64.87 H 7.71

Nuatigenin-3- β -D-glucopyranosid (**9**): 12.1 mg **8** (0.015 mmol) wurden in 5 ml absol. Methanol mit 1.5 ml 0.01 N methanolischer Natriummethylat-Lösung 5 h unter Rückfluß erhitzt^{14, 15}. Nach dem Abkühlen versetzte man mit 2 ml dest. Wasser und schüttelte dreimal mit frisch destilliertem Chloroform (HCl-frei, Umlagerungsgefahr!) aus. Die Chloroformphasen enthielten das nach DC einheitliche Glucosid, das aber nach Einengen (Ausb. 5.2 mg, 58%) nicht kristallisierte und sich auch aus Methanol nicht umkristallisieren ließ, sondern sirupös-lackartig verblieb. Infolgedessen waren die Analysenergebnisse und Drehwertmessungen schwankend. $R_F = 0.39$ (Chloroform/Methanol 65:9). – ¹H-NMR (C₅D₅N): $\delta = 0.87$ (s, CH₃-18), 1.05 (s, CH₃-19), 1.13 (d, $J = 7$ Hz, CH₃-21), 1.37 (s, CH₃-27), 5.1 (d, $J = 7$ Hz, 1-H-Gluc.), 5.4 (d, $J = 4$ Hz, 6-H).

[19/78]