

### Zusammenfassung

Schwerer Stickstoff ist für homogene Brutreaktoren von Bedeutung, falls er billig genug in technischem Maßstab gewonnen werden kann. Die Rektifikation von Stickoxyd dürfte von den bisher vorgeschlagenen Verfahren vom energetischen Standpunkt aus der vorteilhafteste Prozess sein. Er lässt sich weitgehend reversibel gestalten und weist einen grossen elementaren Trenneffekt auf, der nur vom chemischen NO–HNO<sub>3</sub>-Verfahren übertroffen wird. Diesem haftet aber der Nachteil an, dass es mit einer Produktion von Schwefelsäure aus reinem Schwefeldioxyd gekoppelt werden muss. Bei der NO-Rektifikation fehlen unerwünschte Nebenprodukte, willkommen ist dagegen die Möglichkeit, gleichzeitig die schweren Sauerstoffisotope <sup>17</sup>O und <sup>18</sup>O zu gewinnen.

Es werden Rektifikationsversuche mit einer gläsernen Kolonne besonderer Konstruktion beschrieben, welche die in das Verfahren gesetzten Erwartungen bestätigen. In einer 10 mm weiten Kolonne wird ein idealer Boden auf 10 mm Länge erreicht. Wegen des grossen Trennfaktors genügt daher bei einem Arbeitsdruck von 200 mm Hg bereits eine Kolonnenlänge von 31 cm zur Verschiebung des Verhältnisses der beiden Isotope um den Faktor e.

Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Zürich

## 22. Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen

### III. Umsetzung von Aglykonen und Glykosiden mit *Fusarium lini* (BOLLEY)<sup>1)</sup>

4. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen<sup>2)</sup>

von **Ch. Tamm** und **Alice Gubler**

(15. XII. 58)

Die Umwandlung von Steroiden mit Hilfe von Enzymen, die von Mikroorganismen gebildet werden, ist in den vergangenen Jahren in zahlreichen Arbeitskreisen eingehend studiert worden<sup>3)</sup>. Im Vordergrund des Interesses standen dabei, vor allem aus praktisch-technischen Gründen, die C<sub>19</sub>- und C<sub>21</sub>-Steroide; denn unter ihnen finden sich wichtige Hormone und Abwandlungsprodukte derselben mit interessanten biologischen Eigenschaften. Das Verhalten der herzwirksamen Glykoside und Aglykone gegenüber derartigen mikrobiellen Enzymssystemen ist unseres Wissens bisher

<sup>1)</sup> Aus der Dissertation von ALICE GUBLER, Basel 1958.

<sup>2)</sup> 3. Mitt.: CH. TAMM & A. GUBLER, Helv. **41**, 1702 (1958).

<sup>3)</sup> Vgl. die folgenden neueren Übersichtsartikel: J. FRIED, R. W. THOMA, D. PERLMAN, J. E. HERZ & A. BORMAN, Recent Progr. Hormone Res. **11**, 149 (1955); A. WETTSTEIN, Experientia **11**, 465 (1955); S. H. EPPSTEIN, P. D. MEISTER, H. C. MURRAY & D. H. PETERSON, Vitamines and Hormones **14**, 359 (1956); G. M. SHULL, Transact. N. Y. Acad. Sci. Ser. II **19**, 147 (1956); P. TALALAY, Physiol. Review **37**, 362 (1957); E. VISCHER & A. WETTSTEIN, Angew. Chemie **69**, 456 (1957); E. VISCHER & A. WETTSTEIN, Advances in Enzymology **20**, 237 (1958); D. H. PETERSON, Steroid-Symposium des 4. Internationalen Kongresses für Biochemie, Wien, 1.–6. September 1958.

nicht untersucht worden. Es schien uns deshalb gegeben, einen Einblick in den Zusammenhang zwischen Konstitution dieser anders gearteten Substrate und die Reaktionsfähigkeit dieser Enzyme zu gewinnen.

Da sich die Reaktionen mit Mikroorganismen im allgemeinen durch eine ausgeprägte Struktur- und Stereospezifität in bezug auf Ausgangs- und Endprodukte auszeichnen, eröffnet sich gleichzeitig die attraktive Möglichkeit, mit ihrer Hilfe zu neuen interessanten Cardenolidderivaten zu gelangen, deren Herstellung auf rein chemischem Wege wegen der grossen Empfindlichkeit dieser Molekeln auf erhebliche Schwierigkeiten stösst. Schliesslich können mikrobiologische Reaktionen zur Lösung von Konstitutionsproblemen von Nutzen sein.

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Umsetzung von verschiedenen digitaloiden Lactonen und ihren Glykosiden mit Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) (*Fungi imperfecti*)<sup>4)</sup>. Dieser Organismus ist bei Steroiden bisher nicht verwendet worden. Alle Umsetzungen wurden bei 25–27° unter aeroben Bedingungen in Schüttelkulturen mit wachsenden Organismen durchgeführt. Dabei setzten wir zunächst nur sehr kleine Substratmengen ein und verfolgten den Reaktionsverlauf papierchromatographisch unter Anwendung von bekannten Lösungsmittelsystemen und Reagenzien zur Entwicklung der Substanzflecken (siehe weiter unten). Beobachtete man einen merklichen Umsatz, so wurde die Reaktion im präparativen Massstab wiederholt und, wenn möglich, die Produkte in krist. Form nach üblichen Methoden isoliert und charakterisiert. In allen bisher untersuchten Fällen blieb der an C-17 haftende Butenolidring unversehrt.

### I. Aglykone

Wir begannen die Versuche mit *Digitoxigenin* (I) als Substrat, da I der einfachste Vertreter der cardiotonisch wirksamen Cardenolide ist und somit den Grundtyp dieser Stoffklasse darstellt. Nach einer Reaktionszeit von durchschnittlich 11 Tagen konnten wir ein krist. Reaktionsprodukt vom Smp. 207–209° in einer Ausbeute von ca. 40% gewinnen, das nach der Bruttoformel (C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>) eine zusätzliche Hydroxylgruppe enthielt. Nach Smp., Mischprobe, spez. Drehung, Farbreaktion mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Papierchromatogramm (vgl. Fig. 1 und 2), IR.-Spektrum (vgl. Fig. 5) war das Hydroxylierungsprodukt identisch mit *Digoxigenin* (III)<sup>5)6)7)</sup>. Somit ist eine Hydroxylgruppe in die 12 $\beta$ -Stellung des Digitoxigenins eingetreten<sup>8)9)</sup>. Setzten wir als Substrat statt des freien Genins I das 3-O-Acetylderivat II ein, so wurde gleichzeitig mit der Einführung der HO-Gruppe an C-12 die Acetoxygruppe verseift, denn es entstand ebenfalls *Digoxigenin* (III). Die Hydroxylierungsreaktion war gegenüber dem freien Genin bei II bedeutend verlangsamt.

<sup>4)</sup> Einige Resultate dieser Arbeit waren Gegenstand einer vorläufigen Mitteilung: vgl. A. GUBLER & CH. TAMM, Helv. **41**, 297 (1958).

<sup>5)</sup> S. SMITH, J. chem. Soc. **1930**, 508.

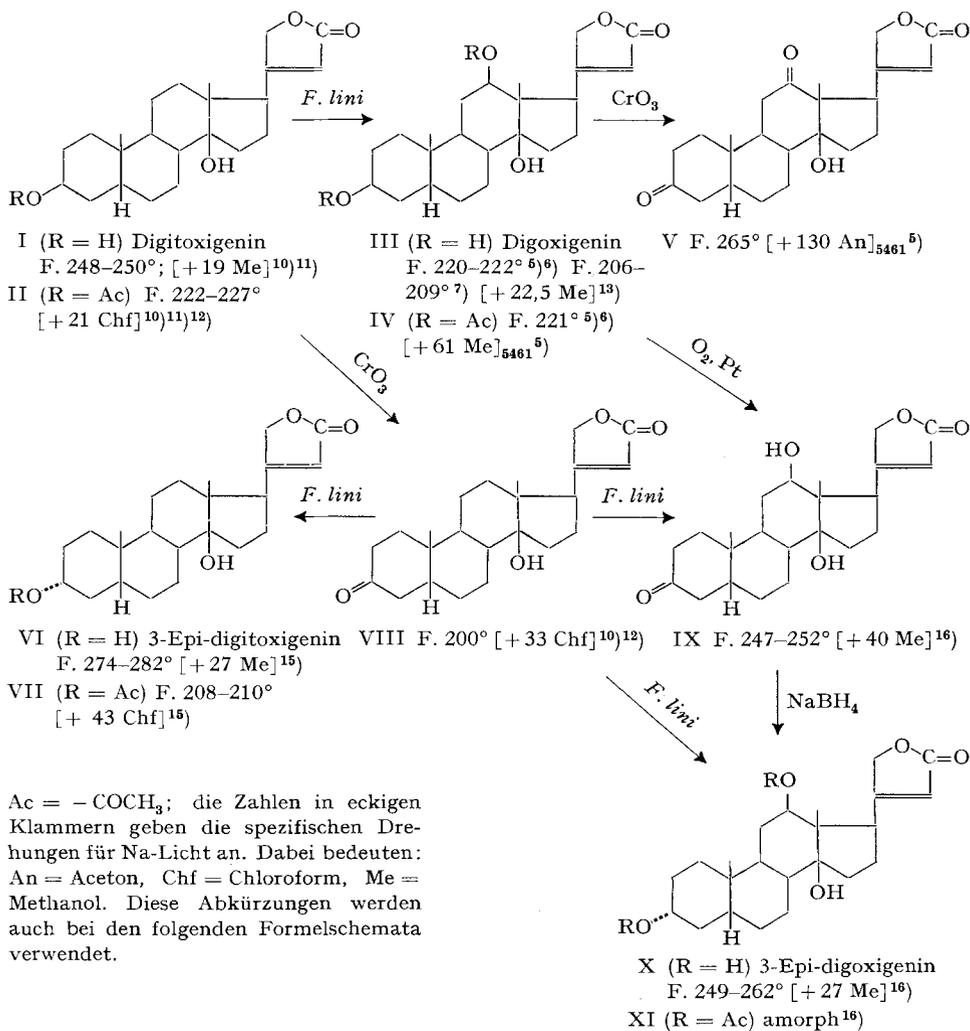
<sup>6)</sup> M. STEIGER & T. REICHSTEIN, Helv. **21**, 828 (1938).

<sup>7)</sup> S. PATAKI, K. MEYER & T. REICHSTEIN, Helv. **36**, 1295 (1953).

<sup>8)</sup> Die mikrobiologische 12 $\beta$ -Hydroxylierung war bisher nicht bekannt. Nach Abschluss unserer Untersuchungen (vgl. auch<sup>4)</sup>) berichteten A. SCHUBERT, G. LANGBEIN & R. SIEBERT, Chem. Ber. **90**, 2576 (1957), und A. SCHUBERT & R. SIEBERT, Chem. Ber. **91**, 1856 (1958), über die 12 $\beta$ -Hydroxylierung mit Kulturen von *Calonectria decora* in der Pregnan-Reihe.

<sup>9)</sup> Inzwischen fand Herr G. JUHASZ, dass auch ein Stamm von *Fusarium avenaceum* und *Trichothecium roseum* *Digitoxigenin* (I) in *Digoxigenin* (III) umwandelt.

Im weiteren suchten wir abzuklären, ob sich durch Modifikation der Digitoxigeninmolekel eine raschere Oxygenierung erzielen liesse. Verwendeten wir zu diesem Zweck 3-Dehydro-digitoxigenin (= Digitoxigenon) (VIII) als Substrat, so nahm die Reaktion einen andern, unerwarteten Verlauf. Das Papierchromatogramm des rohen Reaktionsproduktes zeigte, dass neben Ausgangsmaterial VIII (Fleck A) mindestens



<sup>10)</sup> A. WINDAUS & G. STEIN, Ber. deutsch. chem. Ges. **61**, 2436 (1928).

<sup>11)</sup> F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, Helv. **28**, 1472 (1945).

<sup>12)</sup> K. MEYER & T. REICHSTEIN, Helv. **30**, 1508 (1947).

<sup>13)</sup> A. STOLL & W. KREIS, Helv. **16**, 1049 (1933).

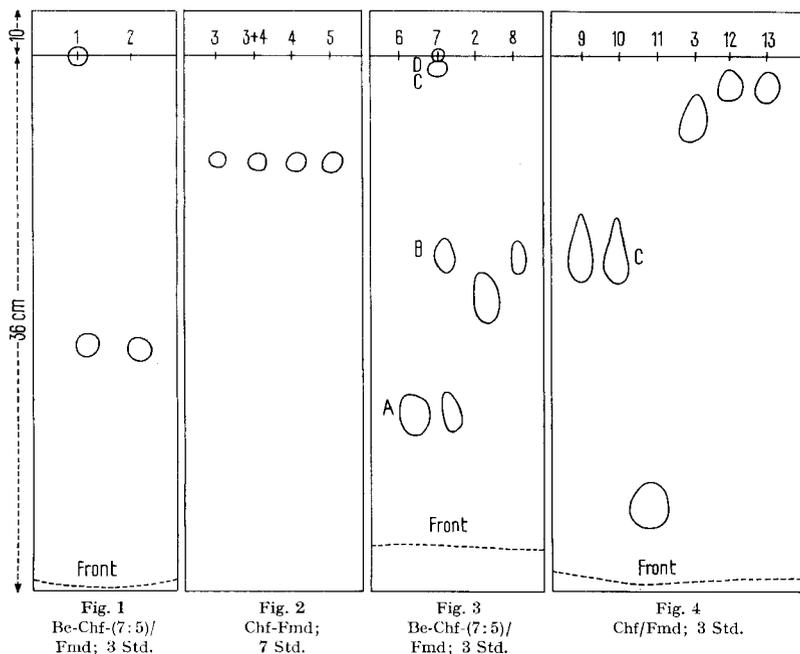
<sup>14)</sup> S. SMITH, J. chem. Soc. **1935**, 1305.

<sup>15)</sup> H. P. SIGG, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. **36**, 985 (1953).

<sup>16)</sup> Exper. Teil dieser Arbeit.

drei neue Stoffe (als B, C und D bezeichnet) entstanden waren (vgl. Fig. 3). Durch Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  und Trennung an Papierbogen liessen sich alle in krist., einheitlicher Form isolieren. Das Hauptprodukt (B) vom Smp. 269–282° (Bruttoformel  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4$ ), das sich in 15% Ausbeute gebildet hatte, war nach seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften (Papierchromatogramm vgl. Fig. 4) mit dem

Papierchromatogramme<sup>17)</sup>



- 1 = Rohes Hydroxyierungsgemisch aus Digitoxigenin (I) mit *F. lini*.
- 2 = Digitoxigenin (I), authent.
- 3 = Digoxigenin (III), authent.
- 4 = Digoxigenin (III) aus Digitoxigenin (I), mikrobiologisch.
- 5 = Digoxigenin (III) aus 3-O-Acetyl-digitoxigenin (II), mikrobiologisch.
- 6 = 3-Dehydro-digitoxigenin (= Digitoxigenon) (VIII) authent.
- 7 = Rohes Reaktionsgemisch aus 3-Dehydro-digitoxigenin (VIII) mit *F. lini*.
- 8 = 3-Epi-digitoxigenin (VI), authent.
- 9 = 3-Dehydro-digoxigenin (IX) aus Digoxigenin (III), synthet.
- 10 = 3-Dehydro-digoxigenin (IX) aus 3-Dehydro-digitoxigenin (VIII), mikrobiologisch.
- 11 = 3,12-Bisdehydro-digoxigenin (= Digoxigenin) (V), authent.
- 12 = 3-Epi-digoxigenin (X) aus 3-Dehydro-digoxigenin (IX), synthet.
- 13 = 3-Epi-digoxigenin (X) aus 3-Dehydro-digitoxigenin (VIII), mikrobiologisch.

bekanntem 3-Epi-digitoxigenin (VI) identisch. Auch das O-Acetylderivat stimmte mit authentischem Material überein. Die Analysenwerte des zweiten Stoffes (C) vom Smp. 247–252° zeigten, dass 1 O-Atom in das Ausgangsmaterial eingetreten war. Es

<sup>17)</sup> Ausgeführt bei 22–25°. An der Startlinie wurden pro Fleck jeweils 0,05–0,075 mg Substanz aufgetragen. Es bedeuten: Be = Benzol, Chf = Chloroform, Fmd = entsäuertes Formamid, THF = Tetrahydro-furan. Für weitere Einzelheiten vgl. die Einleitung zum experimentellen Teil.

handelt sich um das noch unbekanntes *3-Dehydro-digoxigenin* (IX). Die Konstitution von IX ergab sich zunächst aus dem UV.- und IR.-Spektrum, in denen immer noch die gesättigte 3-Ketogruppe erkennbar war (vgl. Fig. 6 und Fig. 7). Sie konnte dann direkt dadurch bewiesen werden, dass Digoxigenin (III) bei der Dehydrierung mit  $O_2$  und Pt als Katalysator<sup>18)19)</sup> einen Stoff lieferte, der mit dem auf mikrobiologischem Wege erhaltenen in allen Eigenschaften übereinstimmte. Der neue Stoff war von 3,12-Bisdehydro-digoxigenin (= Digoxigenon) (V) verschieden. Da in Polyhydroxy-Steroiden unter diesen Bedingungen vorwiegend 3-ständige Hydroxyle dehydriert werden<sup>19)</sup>, nehmen in IX die Ketogruppe die 3-Stellung und die mikrobiologisch eingeführte HO-Gruppe die 12 $\beta$ -Stellung ein. Mit dieser Zuordnung stimmt auch der molekulare Drehungsbeitrag ( $\Delta[M]_D$ -Wert) dieser neuen HO-Gruppe, der bei IX  $+27^\circ \pm 20^\circ$  (in Methanol) beträgt, im Einklang; denn für den  $\Delta[M]_D$ -Wert des 12 $\beta$ -Hydroxyls in Digoxigenin (III) findet man  $+18^\circ \pm 15^\circ$  (in Methanol).

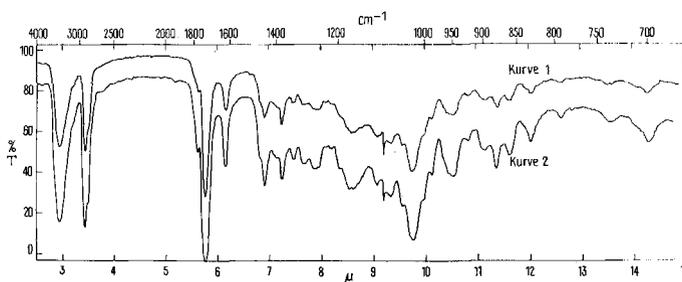


Fig. 5. IR.-Absorptionsspektrum<sup>20)</sup>

Kurve 1: Digoxigenin (III) aus Digitoxigenin (I) (mikrobiologisch). Fest in KBr, kompensiert mit KBr.

Kurve 2: Digoxigenin (III), authentisch. Fest in KBr, kompensiert mit KBr.

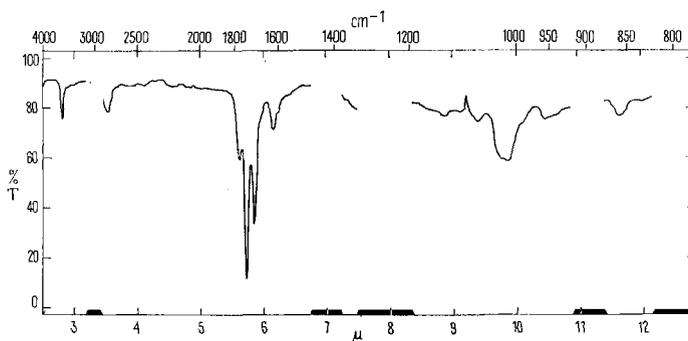


Fig. 6. IR.-Absorptionsspektrum von *3-Dehydro-digoxigenin* (IX)<sup>20)</sup>

In  $CH_2Cl_2$ , gesättigte Lösung;  $d = 1,1$  mm; Banden bei 2,78  $\mu$  (O-H); 5,60–5,62  $\mu$  und 5,72  $\mu$  (C=O, Butenolidring); 5,84  $\mu$  (C=O, 3-Keton); 6,12–6,16  $\mu$  (C=C, Butenolidring)

<sup>18)</sup> H. WIELAND, Ber. deutsch. chem. Ges. **45**, 484, 2606 (1912); **46**, 3327 (1913).

<sup>19)</sup> R. P. A. SNEEDEN & R. B. TURNER, J. Amer. chem. Soc. **77**, 130,190 (1955); vgl. auch A. KATZ, Helv. **40**, 831 (1957), und CH. TAMM & A. GUBLER, Helv. **41**, 1762 (1958).

<sup>20)</sup> Aufgenommen von den Herren Dr. P. ZOLLER, G. ROTZLER und K. STICH mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Spektrophotometer, Modell 21, mit NaCl-Prisma.

Dem dritten in dieser Umsetzung entstandenen Stoff (D) vom Smp. 249–262° erteilen wir die Konstitution des ebenfalls noch unbekanntenen 3-Epi-digoxigenins (X). Der Stoff wurde nur in äusserst geringer Menge gebildet. Er war isomer mit Digoxigenin (III). Stellung und Konfiguration der Hydroxyle an C-3 und C-12 liessen sich wie folgt beweisen: Das oben erhaltene 3-Dehydro-digoxigenin (IX) lieferte bei der Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  eine Substanz, die mit dem mikrobiologischen Umsetzungsprodukt identisch war. Damit ist das Vorliegen des 12 $\beta$ -ständigen Hydroxyls gesichert.

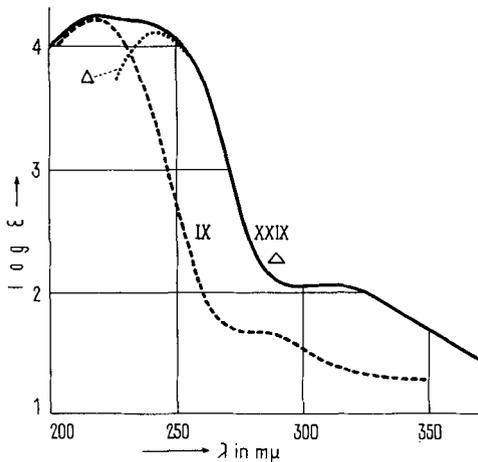


Fig. 7. UV.-Absorptionsspektren in Alkohol<sup>21)</sup>

Kurve IX: 3-Dehydro-digoxigenin (IX), Maxima bei 218  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 4,22$ ), und 283  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 1,66$ ); ber. auf  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$ .

Kurve XXIX: 3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidol (XXIX), Maxima bei 219  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 4,24$ ) und 305–310  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 2,05$ ); ber. auf  $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_5$ .

Kurve  $\Delta$ : Differenzkurve  $\log (\epsilon_{\text{XXIX}} - \epsilon_{\text{Digoxigenin}})$ . Maxima bei 243  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 4,11$ ) und 305–310  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 2,05$ ).

Da bei der Reduktion von 3-Keto-Steroiden mit Metallhydriden vorwiegend die Epimeren mit äquatorialer HO-Gruppe gebildet werden<sup>22)</sup>, kommt dieser in X, wo die Ringe A und B *cis*-ständig verknüpft sind, die  $\alpha$ -Stellung zu. 3-Epi-digoxigenin (X) zeigte wie erwartet eine etwas stärkere Rechtsdrehung als Digoxigenin (III). Die Verschiebung der molekularen Drehung von III nach X (bzw. 3 $\beta$  nach 3 $\alpha$ ) betrug  $+12^\circ \pm 15^\circ$  (in Methanol), was mit den Angaben der Literatur<sup>15)</sup> sehr gut übereinstimmt. Das Di-O-acetyl-Derivat XI von X kristallisierte bisher nicht.

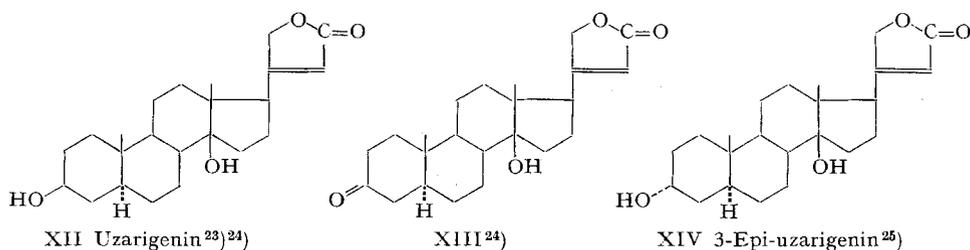
Setzten wir 3-Epi-digitoxigenin (VI) als Substrat den Pilzkulturen zu, so war kein merklicher Umsatz zu beobachten. Dieser Befund deckt sich mit dem Resultat des vorhergehenden Versuches mit VIII, wo sich 3-Epi-digoxigenin (X) nur in Spuren gebildet hatte (Diskussion siehe weiter unten).

Durch eine Anzahl von weiteren Versuchen, in denen das Substrat systematisch variiert wurde, bezweckten wir weitere Einzelheiten über die Beziehung zwischen

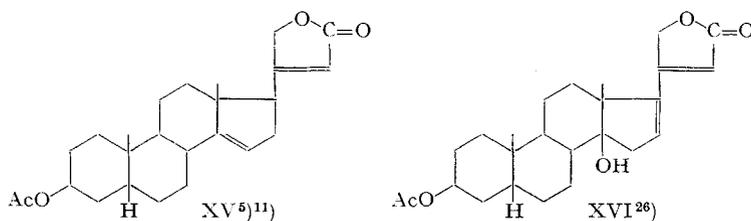
<sup>21)</sup> Aufgenommen von den Herren Dr. P. ZOLLER, G. ROTZLER und K. STICH mit einem Unicam-SP-500-Spektrophotometer mit Sekundär-Elektronenvervielfacher.

<sup>22)</sup> Zur  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion von 3-Oxo-cardenoliden vgl. SIGG *et al.*<sup>15)</sup>

Reaktionsfähigkeit der Enzymsysteme von *F. lini* und Konstitution der eingesetzten Substrate zu erfahren. Schon das Experiment mit 3-Epi-digitoxigenin (VI) hatte gezeigt, dass relativ geringe Veränderungen im Molekelbau des Substrats den gänzlichen Verlust der Reaktionsfähigkeit des Enzyms, das die 12 $\beta$ -Hydroxylierung vermittelt hat, nach sich ziehen. So wurde Uzarigenin (XII), das sich von Digitoxigenin (I) durch die Verknüpfung der Ringe A und B unterscheidet (*trans* statt *cis*), sehr viel schlechter umgesetzt. Nach dem Papierchromatogramm war sicher ein neuer Stoff mit kleinerem Rf-Wert entstanden, welcher der geringen Menge wegen noch nicht untersucht wurde (vgl. Fig. 8). Bei 3-Dehydro-uzarigenin (= Uzarigenon) (XIII) liessen sich nach längerer Inkubation im Papierchromatogramm zwei neue, aber auch nur sehr schwach ausgeprägte, langsamer laufende Flecken erkennen, die nach den Rf-Werten weder Uzarigenin (XII) noch 3-Epi-uzarigenin (XIV) sein konnten, sondern von sauerstoffreicheren Stoffen verursacht werden (vgl. Fig. 8). Sie wurden nicht weiter untersucht.



Wurde in der Digitoxigeninmolekel die 14-Hydroxygruppe durch eine Doppelbindung ersetzt oder eine zusätzliche Doppelbindung an C-16 eingeführt, so trat keine mikrobiologische Oxygenierung ein, wie aus Versuchen mit 3-O-Acetyl-14-anhydro-digitoxigenin (XV) bzw. 3-O-Acetyl-16-anhydro-digitoxigenin (XVI) hervorging.



Interessant war das Verhalten von Dihydro-digitoxigenin (XVII). Bei der Aufarbeitung war nur noch ein geringer Teil des Materials wie üblich regenerierbar. Der Rest des Materials hat offenbar durch den Pilz tiefer greifende Veränderungen erfahren und ist möglicherweise zu kleineren Fragmenten abgebaut worden. Das verbliebene Material enthielt nach dem Papierchromatogramm kein Ausgangsmaterial mehr. Durch Chromatographie an SiO<sub>2</sub> gelang es, Spuren eines krist. Stoffes vom

<sup>23)</sup> S. RANGASWAMI & T. REICHSTEIN, *Helv.* **32**, 939 (1949).

<sup>24)</sup> R. TSCHESCHE & K.-H. BRATHGE, *Chem. Ber.* **85**, 1042 (1952).

<sup>25)</sup> W. SCHMID, H. P. UEHLINGER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **42**, 72 (1959).

<sup>26)</sup> K. MEYER, *Helv.* **29**, 718 (1946).

Smp. 207–214° zu isolieren, der im Papierchromatogramm aber etwas langsamer als das erwartete Dihydro-digoxigenin (XVIII) lief (vgl. Fig. 10). Zum Vergleich bereiteten wir noch 3-Dehydro-dihydro-digoxigenin (XIX) aus XVIII durch selektive Dehydrierung des 3-Hydroxyls mit O<sub>2</sub> und Pt<sup>19</sup>). XIX wanderte etwas rascher als XVIII. Eine weitere Aussage über diese mikrobiologische Reaktion, bei der er sich nicht nur um eine einfache 12 $\beta$ -Hydroxylierung zu handeln scheint, ist nicht möglich.

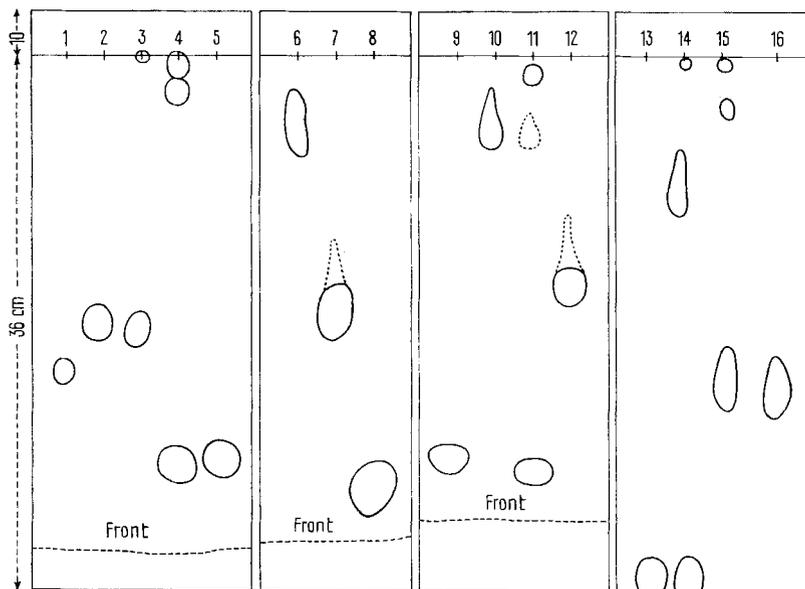
Papierchromatogramme<sup>17)</sup>

Fig. 8  
Be-Chf: (7:5)/Fmd;  
3 Std.

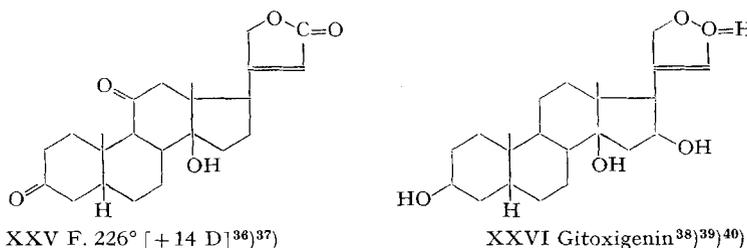
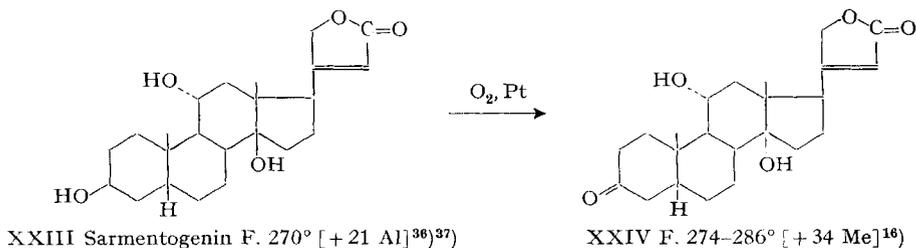
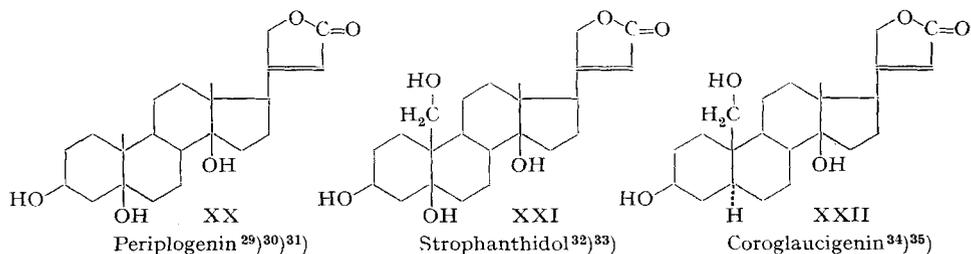
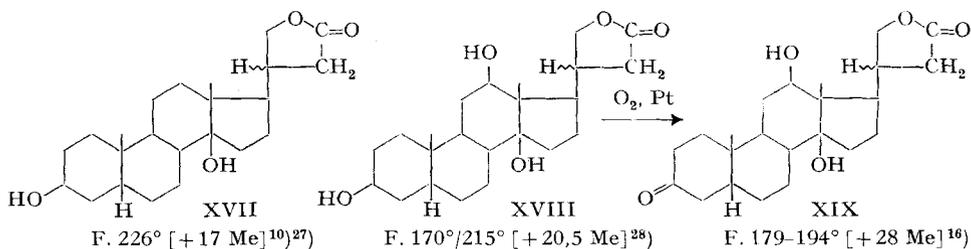
Fig. 9  
Chf/Fmd;  
3 Std.

Fig. 10  
Chf/Fmd;  
3 Std.

Fig. 11  
Chf-Fmd;  
3½ Std.

- 1 = 3-Epi-uzarigenin (XIV), authent.
- 2 = Uzarigenin (XII), authent.
- 3 = Rohes Reaktionsgemisch aus Uzarigenin (XII) mit *F. lini*.
- 4 = Rohes Reaktionsgemisch aus 3-Dehydro-uzarigenin (= Uzarigenon) (XIII) mit *F. lini*.
- 5 = 3-Dehydro-uzarigenin (= Uzarigenon) (XIII).
- 6 = Sarmentogenin (XXIII), authent.
- 7 = 3-Dehydro-sarmentogenin (XXIV).
- 8 = 3,11-Bisdehydro-sarmentogenin (= Sarmentogenon) (XXV).
- 9 = Dihydro-digitoxigenin (XVII).
- 10 = Dihydro-digoxigenin (XVIII).
- 11 = Kristallisat vom Smp. 207–214° aus Dihydro-digitoxigenin (XVII) mit *F. lini*.
- 12 = 3-Dehydro-dihydro-digoxigenin (XIX).
- 13 = 3-Dehydro-5-anhydro-periplogenin (= 5-Anhydro-periplogenon) (XXVII), authent.
- 14 = Rohes Reaktionsgemisch aus 3-Dehydro-5-anhydro-periplogenin (XXVII) mit *F. lini*.
- 15 = Rohes Reaktionsgemisch aus Periplogenin (XX) mit *F. lini*.
- 16 = Periplogenin (XX).

In diesem Zusammenhang suchten wir noch abzuklären, ob Cardenolide, die sich von Digitoxigenin (I) durch zusätzliche Hydroxylgruppen bzw. Sauerstofffunktionen unterscheiden, durch *F. lini* angegriffen werden. Diese Versuchsreihe enttäuschte die



<sup>27)</sup> H. M. E. CARDWELL & S. SMITH, J. chem. Soc. **1954**, 2012.

<sup>28)</sup> S. SMITH, J. chem. Soc. **1930**, 2478.

<sup>29)</sup> E. LEHMANN, Arch. Pharmaz. **235**, 157 (1897).

<sup>30)</sup> A. STOLL & J. RENZ, Helv. **22**, 1193 (1939).

<sup>31)</sup> P. SPEISER & T. REICHSTEIN, Helv. **30**, 2143 (1947).

<sup>32)</sup> E. RABALD & J. KRAUS, Z. physiol. Chem. **265**, 39 (1940).

<sup>33)</sup> W. BLOME, A. KATZ & T. REICHSTEIN, Pharmac. Acta Helv. **21**, 325 (1946).

<sup>34)</sup> A. STOLL, A. PEREIRA & J. RENZ, Helv. **32**, 293 (1949).

<sup>35)</sup> A. HUNGER & T. REICHSTEIN, Helv. **35**, 1073 (1952).

<sup>36)</sup> W. A. JACOBS & M. HEIDELBERGER, J. biol. Chemistry **81**, 765 (1929).

<sup>37)</sup> A. KATZ, Helv. **31**, 993 (1948).

<sup>38)</sup> A. WINDAUS & G. SCHWARTE, Ber. deutsch. chem. Ges. **58**, 1515 (1925).

<sup>39)</sup> A. WINDAUS, K. WESTPHAL & G. STEIN, Ber. deutsch. chem. Ges. **61**, 1847 (1928).

<sup>40)</sup> H. HIRSCHMANN & F. B. HIRSCHMANN, J. Amer. chem. Soc. **78**, 3755 (1956); weitere Lit. daselbst.

Erwartungen. Zwar konnten wir in einem Vorversuch mit Periplogenin (XX) einen guten Umsatz zu mindestens zwei, im Papierchromatogramm langsamer wandernden Stoffen wahrnehmen (vgl. Fig. 11), doch konnte dieser aussichtsreiche Versuch wegen der relativen Seltenheit dieses Aglykons noch nicht mit grösseren Mengen wiederholt werden. Über die  $12\beta$ -Hydroxylierung von Gitoxigenin (XXVI) ist bereits berichtet worden<sup>2)</sup>. Völlig negative Resultate lieferten Strophanthidol (XXI)<sup>41)</sup>, Coroglaucigenin (XXII), Sarmentogenin (XXIII) sowie 3-Dehydro-sarmentogenin (XXIV) und 3,11-Bisdehydro-sarmentogenin (= Sarmentogenon) (XXV). XXIII, XXIV und XXV wurden wegen ihrer Sauerstofffunktion an C-11 als Substrate eingesetzt, um zu prüfen, ob diese die  $12\beta$ -Hydroxylierung fördert, unterdrückt oder die Oxygenierung nach einer anderen Stellung dirigiert. 3-Dehydro-sarmentogenin (XXIV) war noch unbekannt; es wurde aus Sarmentogenin (XXIII) durch katalytische Dehydrierung mit  $O_2$  und Pt<sup>19)</sup> hergestellt. Im Papierchromatogramm wanderte das Monoketon XXIV zwischen XXIII und dem Diketon XXV (vgl. Fig. 9).

Für eine erfolgreiche mikrobiologische Umsetzung hatte sich in der Androstan- bzw. Pregnan-Reihe eine  $\Delta^4$ -3-Keton-Gruppierung als besonders günstige strukturelle Voraussetzung erwiesen. Es schien uns deshalb wünschenswert, entsprechend gebaute Cardenolidderivate in die Versuche mit *F. lini* einzubeziehen. Das einfachste derartige Analogon stellt 3-Dehydro-5-anhydro-periplogenin (= 5-Anhydro-periplogeninon (XXVII) dar. Leider war wegen Materialmangel auch hier nur ein Vorversuch möglich. Wie bei Periplogenin (XX) waren im Papierchromatogramm des Rohprodukts mindestens zwei neue, sehr langsam laufende Flecken zu erkennen (vgl. Fig. 11). Als nächsten Stoff prüften wir das sauerstoffreichere 3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidol (XXIX). XXIX war unbekannt und wurde in Anlehnung an die Angaben von KATZ<sup>42)</sup> aus Strophanthidol (XXI) durch selektive Dehydrierung der 3-Hydroxygruppe mit  $O_2$  und Pt<sup>19)</sup> und anschliessende Eliminierung der 5-Hydroxygruppe durch kurzes Kochen mit Eisessig<sup>32)</sup> hergestellt. Im UV.-Spektrum war die neue  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketongruppe von XXIX deutlich sichtbar (vgl. Fig. 6). Durch Subtraktion der Extinktionswerte von Digitoxigenin (I) wurde die Differenzkurve erhalten, deren Absorptionsmaximum bei  $242\text{ m}\mu$  ( $\log \epsilon = 4,11$ ) genau der erwarteten  $\Delta^4$ -3-Ketongruppierung entsprach (vgl. Fig. 6). Damit im Einklang war auch das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 12)<sup>43)</sup>. Als Nebenprodukt bildete sich dabei durch Oxydation der angulären Hydroxymethylgruppe an C-10 etwas 3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidin (XXXI)<sup>44)</sup>. Auf die Isolierung der beiden Zwischenprodukte XXVIII und XXX wurde verzichtet. Das erhaltene  $\Delta^4$ -3-Keton XXIX wurde von *F. lini* im Gegensatz zu 3-Dehydro-5-anhydro-periplogenin (XXVII) nicht angegriffen.

<sup>41)</sup> Mit Strophanthidin und andern Aldehyden wurden wegen der Sauerstoffempfindlichkeit dieser Gruppe keine mikrobiologischen Versuche unternommen.

<sup>42)</sup> A. KATZ, Helv. 40, 831 (1957). Wir danken Herrn Dr. A. KATZ für die Angabe der Versuchsbedingungen vor ihrer Publikation.

<sup>43)</sup> Vor allem fehlte dort die Bande bei  $5,81\ \mu$ , die für die Aldehydgruppe an C-10 charakteristisch ist, was zeigt, dass in diesem Stoff die anguläre Hydroxymethylgruppe nicht oxydiert worden ist.

<sup>44)</sup> Das IR.-Spektrum stimmte mit demjenigen, das KATZ<sup>42)</sup> publiziert hatte, gut überein. Vor allem trat bei  $5,81\ \mu$  die Aldehydbande auf. Wir erreichten jedoch den in der Lit.<sup>42)</sup> angegebenen Smp. nicht, da sich dieser Aldehyd als äusserst luftempfindlich erwies. Auch die von uns gefundene spez. Drehung wich etwas ab. An der Identität der beiden Präparate ist jedoch nicht zu zweifeln.

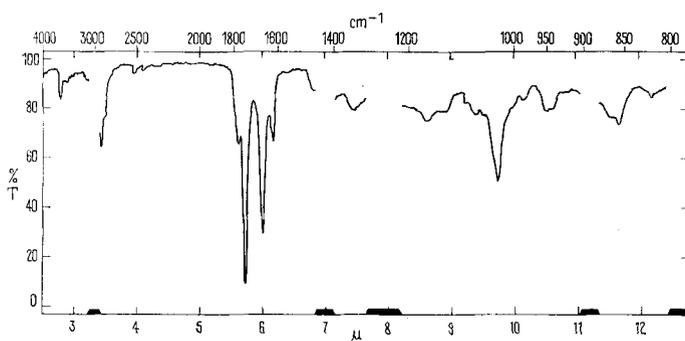
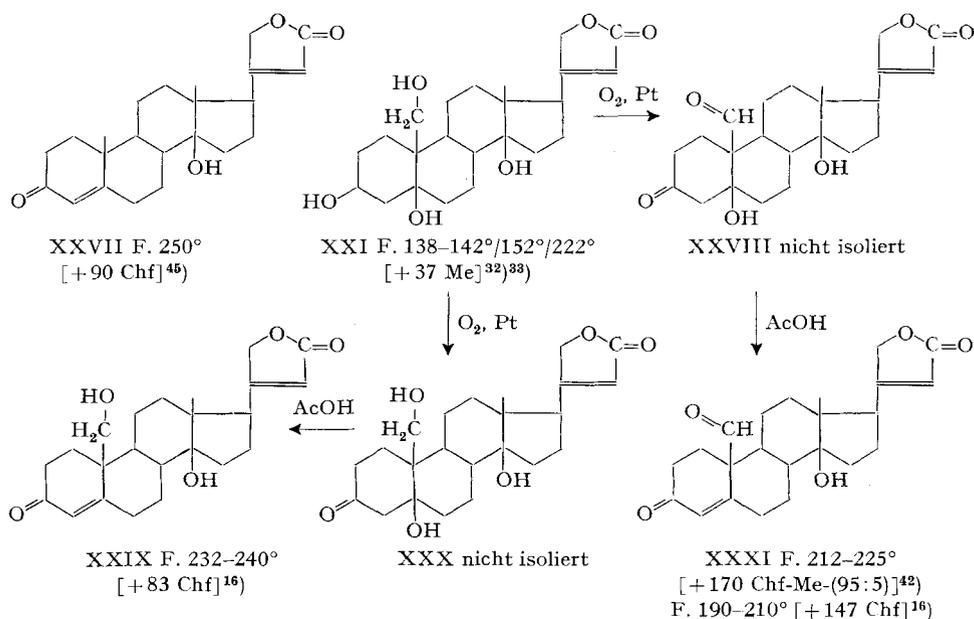


Fig. 12. IR.-Absorptionsspektrum von 3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidol (XXIX)<sup>20)</sup>. In  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , gesättigte Lösung;  $d = 0,5 \text{ mm}$ ; Banden bei  $2,79 \mu$  (O-H);  $5,61 \mu$  und  $5,73 \mu$  (C=O, Butenolidring);  $5,99 \mu$  ( $\Delta^4$ -3-Keton);  $6,17 \mu$  (C=C, Butenolidring)

## II. Glykoside

Die Leichtigkeit der  $12\beta$ -Hydroxylierungsreaktion an Digitoxigenin (I) durch *F. lini* ermunterte uns, die Umsetzungen auf geeignete Glykoside auszudehnen. Die Reaktionsfähigkeit des erwähnten Mikroorganismus veränderte sich gegenüber diesen Substraten wesentlich, denn an keinem der eingesetzten freien oder acetylierten Glykoside konnten wir bisher eine Oxygenierung beobachten. Sofern die freien Glykoside keine endständige D-Glucosereste enthielten, blieben sie auch nach längerer Inkubationszeit unverändert. Bei den O-Acetylderivaten wurden die Acetoxygruppen weitgehend verseift und die freien Glykoside erhalten. Diese Ergebnisse werden durch die in Tab. 1 aufgeführten Versuche, wo sich noch Einzelheiten über Reaktions-

<sup>45)</sup> H. HELFENBERGER & T. REICHSTEIN, Helv. 35, 1503 (1952).

bedingungen und Ausbeuten finden, belegt. Dazu ist folgendes zu bemerken: In den Versuchen Nr. 1–8 handelt es sich um Glykoside bzw. deren O-Acetyl-derivate, die sich alle von Digitoxigenin (I) ableiten und sich somit nur im Zuckerteil voneinander unterscheiden. Konstitution und Anzahl der Zucker scheinen die Aktivität der hydroxylierenden Enzymsysteme nicht wesentlich zu beeinflussen. Die Abspaltung von endständigen D-Glucosereste weist auf eine Glucosidase in *F. lini* hin. Es ist bekannt, dass viele Mikroorganismen Glucosidasen enthalten<sup>46)</sup>. Für die Aktivität dieses Enzyms scheint es unwichtig zu sein, ob der Glucoserest an einem Zucker oder an das Aglykon direkt gebunden ist<sup>47)</sup> (vgl. Versuche 7 und 12). Bei den acetylierten D-Glucosereste enthaltenden Glykosiden kommen Glucosidase und Esterase zur Wirkung. So lieferten z. B. Hepta-O-acetyl-echujin (XXXIX) (Vers. Nr. 8), das acetylfreie Monoglycosid Somalin (XXXVI), Hepta-O-acetyl-k-strophanthosid (XLIV) und Tetra-O-acetyl-k-strophanthin- $\beta$  (XLVI) freies Cymarin (XLVII) (Versuche Nr. 10 und 11) und schliesslich Tetra-O-acetyl-strophanthidin- $\beta$ -D-glucosid (XLIX) Strophanthidin (Versuch Nr. 12).

1. Digitoxigenin-D-Digitoxosyl-D-Digitoxosyl-D-Digitoxosyl XXXII (R = H): *Digitoxin*<sup>10)48)</sup>  

|  
OR

|  
OR

|  
(OR)<sub>2</sub>

XXXIII: R = Ac<sup>16)</sup>
2. Digitoxigenin-L-Rhamnosyl XXXIV (R = H): *Evomonosid*<sup>49)50)</sup>  

|  
(OR)<sub>3</sub>

XXXV: R = Ac<sup>50)51)</sup>
3. Digitoxigenin-D-Cymarosyl XXXVI (R = H): *Somalin*<sup>52)</sup>  

|  
OR

XXXVII: R = Ac<sup>53)</sup>
4. Digitoxigenin-D-Cymarosyl-D-Glucosyl-D-Glucosyl XXXVIII (R = H): *Echujin*<sup>54)</sup>  

|  
(OR)<sub>3</sub>

|  
(OR)<sub>4</sub>

XXXIX: R = Ac<sup>54)</sup>
5. Gitoxigenin-D-Cymarosyl: XL (R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H): 16-Desacetyl-honghelosid A<sup>55)</sup>  

|  
OR<sub>1</sub>

|  
OR<sub>2</sub>

XLI (R<sub>1</sub> = Ac; R<sub>2</sub> = H): Honghelosid A<sup>55)</sup>

XLII: (R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = Ac)<sup>56)</sup>
6. Strophanthidin-D-Cymarosyl-D-glucosyl-D-glucosyl XLIII (R = H): *k-Strophanthosid*<sup>56)</sup>;  

|  
(OR)<sub>3</sub>

|  
(OR)<sub>4</sub>

XLIV: R = Ac<sup>56)</sup>
7. Strophanthidin-D-cymarosyl-D-glucosyl XLV (R = H): *k-Strophanthin- $\beta$* <sup>56)57)</sup>  

|  
(OR)<sub>4</sub>

XVLVI: R = Ac<sup>56)</sup>

<sup>46)</sup> Literatur vgl. bei A. STOLL & J. RENZ, *Enzymologia* **7**, 362 (1939); A. STOLL, J. RENZ & A. BRACK, *Helv.* **34**, 395 (1951); CH. TAMM, *Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe* **13**, 137 (1956); sowie auch C. H. HASSALL & B. S. W. SMITH, *Chemistry & Ind.* **1957**, 1570.

<sup>47)</sup> Ähnliche Eigenschaften zeigen z. B. die aus *Aspergillus oryzae* gewonnenen Enzympräparate («Takadiastase», «Takaamylase», «Luizym»); vgl. R. MAULI, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **40**, 284 (1957); weitere Literatur daselbst.

<sup>48)</sup> W. A. JACOBS & A. HOFFMANN, *J. biol. Chemistry* **67**, 333 (1926).

<sup>49)</sup> A. MEYRAT & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.* **23**, 135 (1948).

<sup>50)</sup> CH. TAMM & J. P. ROSSELET, *Helv.* **36**, 1309 (1953).

<sup>51)</sup> F. ŠANTAVY & T. REICHSTEIN, *Helv.* **31**, 1655 (1948).

<sup>52)</sup> M. HARTMANN & E. SCHLITTLER, *Helv.* **23**, 548 (1940).

<sup>53)</sup> S. RANGASWAMI & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.* **24**, 159 (1949).

<sup>54)</sup> J. C. HESS, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **35**, 2202 (1952).

<sup>55)</sup> A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **33**, 76 (1950).

<sup>56)</sup> A. STOLL, J. RENZ & W. KREIS, *Helv.* **20**, 1484 (1937).

<sup>57)</sup> W. A. JACOBS & A. HOFFMANN, *J. biol. Chemistry* **67**, 609 (1926).

8. Strophanthidin-D-cymarosyl

XLVII: *Cymar*<sup>56)</sup><sup>57)</sup>

9. Strophanthidin-D-glucosyl

XLVIII (R = H): Strophanthidin- $\beta$ -D-glucosid<sup>58)</sup><sup>59)</sup>XLIX: R = Ac<sup>58)</sup><sup>59)</sup>Tabelle 1. Umsetzung von Glykosiden und O-Acetyl-glykosiden mit Kulturen von *Fusarium lini* bei 25–27°

Versuch Nr.	Substrat	Reaktionsdauer in Tagen	Reaktionsprodukte	Ausbeute in % d. Theorie bezogen auf reine Kristalle <sup>60)</sup>
1	Digitoxin (XXXII)	20	Digitoxin (XXXII)	<sup>61)</sup>
2	Tetra-O-acetyl-digitoxin (XXXIII)	20	Tetra-O-acetyl-digitoxin (XXXIII) + Digitoxin (XXXII)	28% 53%
3	Evomonosid (XXXIV)	17	Evomonosid (XXXIV)	<sup>61)</sup>
4	Tri-O-acetyl-evomonosid (XXXV)	18	Evomonosid (XXXIV) + Tri-O-acetyl-evomonosid (XXXV)	14% ca. 67%
5	Somalin (XXXVI)	17	Somalin (XXXVI)	<sup>61)</sup>
6	Mono-O-acetyl-somalin (XXXVII)	14	Somalin (XXXVI) + Mono-O-acetyl-somalin (XXXVII)	40% <sup>62)</sup>
7	Echujin (XXXVIII)	9	Somalin (XXXVI)	28%
8	Hepta-O-acetyl-echujin XXXIX	9	Somalin (XXXVI)	37%
9	Di-O-acetyl-honghelosid A (XLII)	16	Honghelosid A (XLI) + 16-Desacetyl-honghelosid A (XL)	47% 3%
10	Hepta-O-acetyl-k-strophanthosid (XLIV)	25	Cymar (XLVII)	52%
11	Tetra-O-acetyl-k-strophanthin- $\beta$ (XLVI)	9	Cymar (XLVII) + k-Strophanthin- $\beta$ (XLV)	21% 4%
12	Strophanthidin- $\beta$ -D-glucosid (XLVIII)	9	Strophanthidin	51%
13	Tetra-O-acetyl-strophanthidin- $\beta$ -D-glucosid (XLIX)	9	Strophanthidin	57%

<sup>58)</sup> F. C. UHLE & R. C. ELDERFIELD, J. org. Chemistry **8**, 162 (1943).<sup>59)</sup> R. MAULI, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. **40**, 284 (1957).<sup>60)</sup> Die tatsächlichen Ausbeuten dürften wesentlich höher als die in der Kolonne angegebenen Zahlen sein.<sup>61)</sup> Da nach der papierchromatographischen Kontrolle keine Umsetzung erfolgt war, wurde auf die Regenerierung des Ausgangsmaterials verzichtet.<sup>62)</sup> Dieser Stoff wurde nur papierchromatographisch nachgewiesen.

Einen Hinweis auf die unterschiedliche enzymatische Spaltbarkeit von verschiedenen gebundenen Acetoxygruppen vermittelt Versuch Nr. 9, mit Di-O-acetyl-honghelosid A (XLII). Das Hauptprodukt war Honghelosid A (XLI). Von den beiden Acetylgruppen wurde praktisch nur diejenige, die am Zucker haftete, abgespalten, während das Enzym die 16-ständige Acetoxygruppe fast unversehrt liess. Das acetyl-freie Glykosid (XL) trat nur in Spuren auf. Es sei daran erinnert, dass die Verhältnisse bei der basenkatalysierten Hydrolyse gerade umgekehrt liegen, indem die 16-Acetoxygruppen viel rascher als die im Zuckerrest gebundenen Acetylgruppen abgespalten werden.

### III. Diskussion der Ergebnisse

Die beschriebenen Versuche zeigen, dass in *Fusarium lini* sicher vier Enzymsysteme zur Wirkung gelangen können. Das eine vermittelt die Einführung von Hydroxylgruppen in die 12 $\beta$ -Stellung des Sterinskeletts (12 $\beta$ -Hydroxylase), das zweite reduziert stereospezifisch 3-ständige Ketogruppen zur äquatorialen Hydroxylgruppe (Hydrogenase), ein weiteres vermittelt die Hydrolyse von Acetoxygruppen (Esterase), und das vierte begünstigt die Abspaltung von  $\beta$ -glykosidisch gebundenen endständigen D-Glucoseresten ( $\beta$ -Glucosidase). Es ist auffallend, dass diese enzymatischen Umsetzungen, insbesondere die Oxygenierung, bei den Cardenoliden viel langsamer verlaufen als in der Androstan- bzw. Pregnan-Reihe, wo wir für diesen Vergleich einige charakteristische Vertreter auf ihr Verhalten gegenüber *F. lini* geprüft haben<sup>63</sup>). Vermutlich wird dieser Unterschied zur Hauptsache durch die  $\beta$ -ständige Verknüpfung der Ringe C und D bei den Cardenoliden bedingt.

Die Verseifung von Acetoxygruppen durch Mikroorganismen ist kein neuer Befund; sie ist bei acetylierten Pregnanderivaten schon häufig beobachtet worden (vgl. <sup>3</sup>). – Auch Glucosidasen werden, wie bereits erwähnt, oft in Mikroorganismen angetroffen.

Aus den mitgeteilten Ergebnissen kann man den Schluss ziehen, dass *F. lini* nur einige wenige Vertreter der Cardenolidreihe, nämlich die relativ sauerstoffarmen Genine Digitoxigenin (I), Gitoxigenin (XXVI) und eventuell Periplogenin (XX) in der 12 $\beta$ -Stellung hydroxylieren kann. Es handelt sich offenbar um eine biologische Reaktion, die auf geringe Änderung im Molekelbau des Substrats sehr empfindlich ist. Änderung in der Verknüpfung der Ringe A und B (Bsp. Uzarigenin), Epimerie an C-3 (Bsp. 3-Epi-digitoxigenin) und zusätzliche HO-Gruppen bringen die Reaktion beinahe zum Erlahmen. Bei 3-Dehydro-digitoxigenin (VIII) tritt das reduzierende Enzymsystem in den Vordergrund, das die 3-Ketogruppe ausschliesslich in die äquatoriale HO-Gruppe verwandelt<sup>64</sup>). Im Vergleich zum Genin wird das 3-Keton VIII nur noch sehr langsam oxygeniert. Beim isomeren 3-Dehydro-uzarigenin (XIII) (Ringe A und B *trans* verknüpft) wird merkwürdigerweise die 3-Ketogruppe nicht reduziert, denn unter den Reaktionsprodukten findet sich weder Uzarigenin (XII), das wegen des äquatorialen 3-Hydroxyls am ehesten erwartet wurde, noch 3-Epi-uzarigenin (XIV). Aber auch in 3-Dehydro-sarmentogenin (XXIV) und 3,11-Disdehydro-sarmentogenin (= Sarmentogenon (XXV)) wurden die Ketogruppen nicht merklich reduziert.

<sup>63</sup>) A. GUBLER & CH. TAMM, Helv. **41**, 301 (1958).

<sup>64</sup>) Vgl. das analoge Verhalten von 3-Dehydro-gitoxigenin<sup>2</sup>).

Eine Doppelbindung an C-14 an Stelle der  $14\beta$ -Hydroxygruppe des Digitoxigenins unterbindet die  $12\beta$ -Hydroxylierung völlig, ebenso eine zusätzliche Doppelbindung an C-16. Bemerkenswert und noch ungeklärt ist das Verhalten von Dihydro-digitoxigenin (XVII) gegenüber *F. lini*. Der hydrierte Butenolidring scheint im Mikroorganismus weitere Reaktionen auszulösen. Die Einführung der  $\Delta^4$ -3-Ketongruppierung brachte weder eine qualitative noch quantitative Verschiebung der mikrobiologischen Reaktion mit sich. War ein Genin mikrobiologisch hydroxylierbar, so setzte sich auch das entsprechende ungesättigte Keton um (z. B. Digitoxigenin (I) und 3-Dehydro-5-anhydro-periplogenin (XXVII)). blieb das Genin unverändert, so reagierte auch das  $\Delta^4$ -3-Keton nicht, wie Strophanthidol (XXI) und 3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidol (XXIX) zeigten.

Die mikrobiologische  $12\beta$ -Hydroxylierung von Digitoxigenin (I) besitzt eine interessante Parallele in der ganz kürzlich von BROWN *et al.*<sup>65)</sup> sowie REPKE<sup>66)</sup> beobachteten  $12\beta$ -Hydroxylierung von Digitoxin, Gitoxin und Digitoxigenin im menschlichen und tierischen Organismus. Allerdings ist die Hydroxylierung von Glykosiden auf mikrobiologischem Wege noch nicht gelungen. Möglicherweise sind dafür rein sterische Gründe verantwortlich. Vielleicht wird das Enzym von den stark hydroxylierten Stoffen, seien es Aglykone oder Glykoside, durch die HO-Gruppen abgefangen und kann nicht mehr zur Wirkung gelangen.

Einen weiteren bemerkenswerten Hinweis auf die Substratspezifität vermittelten uns die Versuche an den C<sub>19</sub>- und C<sub>21</sub>-Steroiden Androsten-(4)-dion-(3,17), Testosteron, Progesteron und Cortexon mit dem gleichen Stamm von *F. lini*, wo statt der  $12\beta$ -Hydroxylierung fast ausschliesslich  $15\alpha$ -Hydroxylierung eintrat<sup>63)</sup>. Die  $14\beta$ -ständige HO-Gruppe in Digitoxigenin (I) scheint den enzymatischen Angriff an C-15, wahrscheinlich aus sterischen Gründen, zu verhindern und in die 12-Stellung zu dirigieren<sup>67)</sup>. Diese Befunde zeigen deutlich, dass derartige enzymatische Reaktionen in verschiedenen Steroidklassen ganz verschieden verlaufen können und dass entsprechende Analogieschlüsse nur mit Vorsicht zu ziehen sind.

Wir danken der SANDOZ AG., Basel, für die Unterstützung dieser Arbeit. Ferner möchten wir Herrn Dr. CH. STOLL, Institut für spezielle Botanik, ETH, Zürich, für seine grosse Hilfe und zahlreichen Ratschläge bei der Züchtung der Mikroorganismen unseren besten Dank aussprechen.

### Experimenteller Teil<sup>68)</sup>

Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze bis 200° etwa  $\pm 2^\circ$ , darüber etwa  $\pm 3^\circ$ . Substanzproben zur Messung der spez. Drehung, zur Aufnahme der UV.- und IR.-Spektren wurden 1 Std. bei 0,02 Torr und 60–70° und zur Analyse bei 0,01 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (im Schweinchen) bei der angegebenen Zeit und Temperatur getrocknet. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chloroform oder Chloroform-Alkohol-(3:1), Waschen mit 2-n. HCl, 2-n. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser, Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen. Die Adsorptionschromatogramme wurden nach der Durchlaufmethode<sup>69)</sup> mit neutralem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> der Aktivitätsstufe I der Fa. M. WOELM, Eschwege, Deutschland, oder an Silicagel (SiO<sub>2</sub>, Korngrösse 0,15–0,30 mm) durchgeführt. Zur Papierchromatographie wurde Papier WHATMAN

<sup>65)</sup> B. T. BROWN, S. E. WRIGHT, G. T. OKITA, *Nature* **180**, 607 (1957).

<sup>66)</sup> K. REPKE, *Naturw.* **45**, 94, 366 (1958).

<sup>67)</sup> Es könnte sich auch um die Wirkungen von zwei verschiedenen Hydroxylasen handeln.

<sup>68)</sup> Bei einem Teil der Experimente war Herr W. ZÜRCHER in geschickter und gewissenhafter Weise behilflich.

<sup>69)</sup> T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Disc. Farad. Soc.* Nr. **7**, 305 (1949).

Nr. 1 und als stationäre Phasen Formamid<sup>70)</sup> (Imprägnieren mit Formamid-Aceton-(1:3) oder (1:4) nach <sup>71)</sup> oder Wasser<sup>72)</sup> sowie Lösungsmittelsysteme von KAISER<sup>73)</sup> verwendet. Entwicklung mit RAYMOND-Reagens<sup>70)</sup>, KEDDE-Reagens<sup>74)</sup> oder Tetranitrodiphenyllösung<sup>59)</sup> der Cardenolide und mit SbCl<sub>3</sub>-Reagens<sup>75)</sup> der Cardanolide. Farbreaktion mit 84-proz. und konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nach Lit.<sup>76)</sup>.

Bei den Chromatogrammen werden die nachstehenden Abkürzungen benützt: Chf = Chloroform, Me = Methanol.

### I. Kultur der Mikroorganismen

Proben einer Schrägagarkultur von *Fusarium lini* (BOLLEY) (Herkunft: *Centralbureau voor Schimmelcultures*, Baarn, Niederlande) wurden zur Sporulierung auf Reismährmedium (13 g polierter Reis und 25 ml Wasser in ERLLENMEYER-Kolben von 500 ml) überimpft. Eine wässrige Suspension der drei Wochen alten, bei 27° inkubierten Kulturen wurde als Impfmateriale verwendet. Zum Versuch kamen 100-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 20 ml Nährlösung (3 g NaNO<sub>3</sub>; 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O; 0,5 g KCl; 0,01 g FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O; 30 g Saccharose und Wasser ad 1000 ml) zur Anwendung. Diese wurden bei 120° während 20 Min. im Dampfautoklaven sterilisiert. Die Kulturgefäße wurden hierauf mit je 1 ml Sporensuspension 5–6 Tage bei 27° auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 U./Min.) inkubiert, worauf das in Aceton gelöste Substrat nach Sterilfiltration zugesetzt wurde.

### II. Aglykone

*Umwandlung von Digitoxinin (I) in Digoxigenin (III) durch Fusarium lini.* Eine Lösung von 55 mg I vom Smp. 244–250° in 11 ml Aceton wurde auf 11 100-ml-ERLENMEYER-Kolben (je 20 ml Nährlösung enthaltend) steril verteilt und 11 Tage bei 25–27° unter Belüftung auf einer rotierenden Maschine (170 U./Min.) geschüttelt. Nach 11 Tagen zeigte das Papierchromatogramm kein Ausgangsmaterial mehr. Die Nährlösung wurde abgenutscht, das Mycel mit Chloroform und anschließend mit Alkohol gründlich nachgewaschen und ausgepresst. Das Filtrat wurde im Vakuum bei 40–50° vom Alkohol weitgehend befreit und dreimal mit je 400 ml Chloroform und zweimal mit Chloroform-Alkohol-(3:1) ausgeschüttelt. Diese Auszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 52 mg Rohprodukt (Papierchromatogramm vgl. Fig. 1), das an 1,6 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert wurde. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 5 ml Lösungsmittel.

Die Fraktionen 1–3 (eluiert mit Be-Chf-(9:1)) gaben 8,8 mg Öl; KEDDE-Reaktion negativ, verworfen.

Die Fraktionen 4–14 (eluiert mit Be-Chf-(4:1) und (1:1)) ergaben wenig amorphes Material; KEDDE-Reaktion negativ, verworfen.

Die Fraktionen 15–21 (24 mg, eluiert mit Chf) ergaben aus Aceton-Äther 20 mg reines Digoxigenin (III) in Prismen vom Smp. 207–209°;  $[\alpha]_D^{25} = +22,5^\circ \pm 2^\circ$  (c = 1,0614; Methanol). Misch-Smp. mit authent. Material war gleich. Farbreaktion mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Laufstrecke im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 2) und IR.-Spektrum (vgl. Fig. 5) stimmten mit denjenigen von authent. Material überein. Ausbeute ca. 40% der Theorie.

Trocknung zur Analyse: 5 Std. bei 120° (OAB).

C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> (390,23) Ber. C 70,74 H 8,78% Gef. C 70,49 H 8,60%

*Umwandlung von 3-O-Acetyl-digitoxinin (II) in Digoxigenin (III) durch F. lini.* Eine Lösung von 125 mg II vom Smp. 220–226° in 25 ml Aceton wurde zu 25 100-ml-ERLENMEYER-Kolben steril zugegeben und bei 25–27° auf der rotierenden Maschine (170 U./Min.) unter Belüftung geschüttelt. Nach 20 Tagen wurde, wie bei I beschrieben, aufgearbeitet. Es resultierten 150 mg Rohprodukt, das an 4 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert wurde. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 12 ml Lösungsmittel.

<sup>70)</sup> O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 108 (1951).

<sup>71)</sup> H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 357 (1953).

<sup>72)</sup> E. SCHENKER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **37**, 680 (1954).

<sup>73)</sup> F. KAISER, *Chem. Ber.* **88**, 556 (1955).

<sup>74)</sup> I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.* **52**, 643 (1952).

<sup>75)</sup> D. LAWDAY, *Nature* **170**, 415 (1952).

<sup>76)</sup> J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* **31**, 883 (1948).

Die Fraktionen 1–11 (eluiert mit Be-Chf-(9:1)) gaben 10 mg Öl; KEDDE-Reaktion negativ, verworfen.

Die Fraktionen 12–14 (31 mg, eluiert mit Be-Chf-(3:1)) ergaben aus Aceton-Äther 20 mg *O*-Acetyl-*digitoxigenin* (III) in Prismen vom Smp. 218–226°. Nach Mischprobe und Papierchromatogramm identisch mit authent. Material.

Die Fraktionen 15–18 (eluiert mit Be-Chf-(1:1)) gaben wenig amorphes Material.

Die Fraktionen 19–23 (39 mg, eluiert mit Chf) gaben aus Aceton-Äther 30 mg *Digoxigenin* (III) in Nadeln vom Smp. 210–213° (Ausbeute 24%). Nach Misch-Smp., Papierchromatogramm (vgl. Fig. 2) und Farbreaktion identisch mit authent. Material.

*Umwandlung von 3-Dehydro-digitoxigenin (= Digitoxigenon) (VIII) in 3-Epi-digitoxigenin (VI), 3-Dehydro-digoxigenin (IX) und 3-Epi-digoxigenin (X) durch F. lini.* Eine Lösung von 225 mg VIII vom Smp. 200° in 45 ml Aceton wurde steril zu 45 100-ml-ERLENMEYER-Kolben gegeben und bei 25–27° auf der rotierenden Maschine (170 U./Min.) unter Belüftung geschüttelt. Nach 14 Tagen wurde wie bei I beschrieben aufgearbeitet. Es resultierten 340 mg Rohprodukt, das im Papierchromatogramm vier Flecken (A–D) zeigte (vgl. Fig. 3). Es wurde an 8 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 35 ml Lösungsmittel. Resultat s. Tab. 2.

Tabelle 2

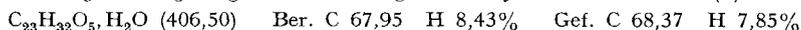
Fr.	Lösungsmittel	roh	Eluat
			Eigenschaften, Identif. oder weitere Verarbeitung
1–8	Be-Pe-Gemische	56 mg	Öl, KEDDE-Reaktion negativ, verworfen
9–12	Be und Be-Chf-(9:1)	Spuren	
13–17	Be-Chf-(4:1)	121 mg	
18–21	Be-Chf-(4:1)	15 mg	Gemisch A + B
22–28	Be-Chf-(4:1)	34 mg	aus An-Ae 27 mg VI, Smp. 269–282° Fleck B
29–37	Be-Chf-(1:1), Chf, Chf-Me(95+5) und (9:1)	70 mg	amorph, Flecke C + D; Präp. Papierchromatogramm

Fraktionen 13–17: Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther *3-Dehydro-digitoxigenin* (VIII) in Prismen vom Smp. 194–198°. Nach Misch-Smp. und Papierchromatogramm (Fig. 3, Fleck A) identisch mit Ausgangsmaterial. Ausbeute 41%.

Fraktionen 22–28: Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther *3-Epi-digitoxigenin* (VI) in Prismen vom Smp. 269–282°. Nach Mischprobe, Papierchromatogramm (vgl. Fig. 3), IR.-Spektrum, Farbreaktionen mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und *O*-Acetyl-Derivat (Smp. 199–209°, bereitet nach Lit.<sup>15</sup>) identisch mit authent. Material. Ausbeute 12,5%.

Fraktionen 29–37<sup>77</sup>): Das Material (70 mg) wurde in 5 ml Chloroform-Methanol-(1:1) gelöst und nach Auftragen auf 10 Papierbogen (Breite 17 cm, ca. 7 mg Substanz pro Bogen) im System Chloroform/Formamid (Imprägnieren mit Formamid-Aceton-(1:4) nach <sup>71</sup>) (Laufzeit 3–4 Std.) getrennt. Die ausgeschnittenen substanzhaltigen Papierzonen wurden mit Methanol eluiert, die Lösungen eingedampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, zweimal mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Es resultierten 24 mg rohes C-haltiges und 8 mg rohes D-haltiges Material.

Das C-haltige Rohprodukt gab aus Aceton-Äther 12 mg *reines 3-Dehydro-digoxigenin* (IX) in Platten vom Smp. 247–252° (Monohydrat);  $[\alpha]_D^{29} = +39^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,803$  in Methanol);  $[\alpha]_D^{26} = +41^\circ \pm 4^\circ$  ( $c = 0,512$ ; Methanol). IR.-Spektrum vgl. Fig. 6, UV.-Spektrum vgl. Fig. 7; Papierchromatogramm vgl. Fig. 4. – Trocknung zur Analyse: 5 Std. bei 120° (S).



<sup>77</sup>) Zur Methodik der präparativen Papierchromatographie vgl. E. VON ARX & R. NEHER, Helv. 39, 1664 (1956).

Das D-haltige Rohprodukt gab aus Aceton-Äther 3 mg 3-Epi-digoxigenin (X) in Nadeln zu Drusen vereinigt vom Smp. 242–251°. Nach Mischprobe, Papierchromatogramm (vgl. Fig. 4), IR.-Spektrum und Farbreaktion mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> identisch mit Präparat, das durch NaBH<sub>4</sub>-Reduktion von IX erhalten wurde (siehe unten).

*3-Dehydro-digoxigenin (IX) aus III.* Eine Suspension von 22 mg PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O in 3 ml bidest. Wasser wurde 1 Std. in H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 22° geschüttelt. Hierauf wurde eine Lösung von 100 mg Digoxigenin (III) vom Smp. 208–212° in 15 ml Aceton und 8 ml bidest. Wasser zugegeben und 24 Std. bei 22° in O<sub>2</sub>-Atmosphäre geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Pt und Nachwaschen mit Aceton wurde das Filtrat im Vakuum vom Aceton befreit und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 95 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 85 mg Platten vom Smp. 248–253°,  $[\alpha]_D^{20} = +39 \pm 4^\circ$  ( $c = 0,803$ ; Methanol). Nach Mischprobe, Papierchromatogramm (vgl. Fig. 4), IR.-Spektrum (vgl. Fig. 6) und Farbreaktion mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (zitronengelb (0 Min.), grüngelb (10 Min.), gelb (40 Min.), gelbrot (50 Min.), mauve mit grüner Randzone (1,5 Std.), violett-rot (3 Std.)), identisch mit Präparat, das aus VIII mikrobiologisch erhalten wurde.

*3-Epi-digoxigenin (X) aus IX.* Zu einer Lösung von 50 mg 3-Dehydro-digoxigenin (IX) vom Smp. 248–254° in 2,5 ml Dioxan-Wasser-(4:1) bei 22° zugetropft. Hierauf wurde noch 6 Std. bei 22° stehengelassen, dann bei 0° mit 2-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bis zur kongosauren Reaktion versetzt, mit 3 ml Wasser versetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Waschen mit Wasser und Eindampfen im Vakuum resultierten 60 mg Rohprodukt, das mit 8 ml Methanol, 8 ml 0,1-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 180 mg D-Mannit 30 Min. unter Rückfluss gekocht wurde. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum wurde mit Chloroform ausgeschüttelt, die Auszüge wurden mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (42 mg) gab aus Aceton-Äther 41 mg Kristalle vom Smp. 246–256°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther Nadeln in Drusen vom Smp. 249–262°,  $[\alpha]_D^{20} = +27 \pm 3^\circ$  ( $c = 0,721$ ; Methanol). IR.-Spektrum (fest in KBr): Banden bei 2,94–2,96  $\mu$  und 3,06  $\mu$  (O–H), 5,54  $\mu$  und 5,76–5,80  $\mu$  (C=O, Butenolidring) und 6,15  $\mu$  (C=C, Butenolidring). Papierchromatogramm vgl. Fig. 4. Farbreaktion mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: zitronengelb (0 Min.), orange (30 Min.), rot (40 Min.), mauve mit grüner Randzone (1,5 Std.), gelbbraun (3 Std.). – Trocknung zur Analyse: 5 Std. bei 110° (S).

C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> (390,50) Ber. C 70,74 H 7,78% Gef. C 71,17 H 8,70%

*Di-O-acetyl-3-epi-digoxigenin (XI).* 11 mg 3-Epi-digoxigenin (X) vom Smp. 246–256° wurden mit 0,5 ml Pyridin und 0,3 ml Acetanhydrid 48 Std. bei 22° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 12 mg Rohprodukt, das auch nach Chromatographie an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bisher nicht kristallisierte.

*Umsetzung von Dihydro-digoxigenin (XVII) mit F. lini.* Eine Lösung von 70 mg Dihydro-digoxigenin (XVII) vom Smp. 200–210° in 14 ml Aceton wurde steril zu 16 100-ml-ERLENMEYER-Kolben gegeben und bei 25–27° auf der rotierenden Maschine (170 U./Min.) unter Belüftung geschüttelt. Nach 9 Tagen wurde wie bei I beschrieben aufgearbeitet (im Papierchromatogramm war kein Ausgangsmaterial mehr sichtbar). Das Rohprodukt (60 mg) wurde an 2 g SiO<sub>2</sub> chromatographiert. Zum Nachwaschen der Fraktionen wurden je 7 ml Lösungsmittel verwendet.

Die Fraktionen 1–3 (eluiert mit Be) gaben nur Spuren amorphes Material.

Die Fraktionen 4–10 (eluiert mit Be-Chf-(1:4)) gaben 1 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 11–14 (9 mg, eluiert mit Chf) gaben aus Aceton-Äther-Petroläther 2,6 mg Kristalle vom Doppelschmelzpunkt 88°/210–228°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther-Petroläther 1 mg Nadeln vom Smp. 207–214°. Papierchromatogramm vgl. Fig. 10.

*3-Dehydro-dihydro-digoxigenin (XIX) aus XVIII.* Eine Suspension von 30 mg PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O in 2 ml bidest. Wasser wurde 1,5 Std. in H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 22° geschüttelt. Hierauf wurde eine Lösung von 33 mg Dihydro-digoxigenin (XVIII) vom Smp. 215–218° in 8 ml Aceton und 3 ml Wasser zugegeben und 23 Std. bei 22° in O<sub>2</sub>-Atmosphäre geschüttelt. Die weitere wie bei IX beschriebene Aufarbeitung ergab 31 mg Rohprodukt, das nach dem Papierchromatogramm noch Ausgangsmaterial enthielt. Die gesamte Menge wurde deshalb in wenig Chloroform gelöst und auf 3 Papierbogen (17 cm breit) aufgetragen und im System Chloroform-Formamid (Imprägnieren mit Aceton-Formamid (4:1)<sup>71</sup>) (3 Std., auf Front) getrennt. Die beiden substanzhaltigen Papierbogen wurden nach Ausschneiden mit Chloroform-Methanol-(1:1) extrahiert, die Extrakte eingedampft und zwischen Wasser und Chloroform verteilt. Die Chloroformlösungen gaben nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen 3,5 mg rohes XVIII und 15 mg rohes XIX. Die letztere

Fraktion gab aus Aceton-Äther 11,5 mg Kristalle vom Smp. 166–186°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther XIX in Prismen vom Smp. 179–194° [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +28° ± 3° (c = 0,627; Methanol). Laufstrecke im Papierchromatogramm vgl. Fig. 10.

*3-Dehydro-sarmentogenin (XXIV) aus XXIII.* Eine Suspension von 100 mg PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O in 12 ml bidest. Wasser wurde 1 Std. in H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 22° geschüttelt. Hierauf wurde eine Lösung von 170 mg Sarmentogenin (XXIII) vom Smp. 270° in 40 ml Aceton und 14 ml bidest. Wasser zugegeben und 24 Std. bei 22° in O<sub>2</sub>-Atmosphäre geschüttelt. Die weitere, wie bei IX beschriebene Aufarbeitung ergab 150 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 145 mg Kristalle vom Smp. 270–280°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther Prismen vom Smp. 275–284° (Zers.); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +34° ± 2° (c = 0,982; Chloroform-Methanol (1:1)). Papierchromatogramm vgl. Fig. 9. Farbreaktionen mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: braungelb (0 Min.), braungelb mit blauer Randzone (10 Min.), blaugraugrün (30 Min. bis 1 Std.), hellgrün (3 Std.). IR.-Spektrum (fest in KBr): Banden bei 2,97–2,99  $\mu$  (O–H); 5,61  $\mu$  und 5,73  $\mu$  (C=O, Butenolidring), 5,87  $\mu$  (C=O, 3-Keton) und 6,19  $\mu$  (C=C, Butenolidring); UV.-Spektrum in Alkohol: Maxima bei 217,5 m $\mu$  (log  $\epsilon$  = 4,19) und 283 m $\mu$  (log  $\epsilon$  = 1,66). – Trocknung zur Analyse: 15 Std. bei 120° (S).

C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> (388,48) Ber. C 71,1 H 8,3 O 20,6% Gef. C 71,4 H 8,6 O 20,8%

*3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidol (XXIX) und 3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidin (XXXI) aus XXI.* Eine Suspension von 40 mg PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O in 6 ml bidest. Wasser wurde 1 Std. in H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 22° geschüttelt. Hierauf wurde eine Lösung von 190 mg Strophanthidol (XXI) vom Smp. 138–140° in 20 ml Aceton und 14 ml bidest. Wasser zugegeben und 24 Std. bei 22° in O<sub>2</sub>-Atmosphäre geschüttelt. Die weitere wie bei IX aus III beschriebene Aufarbeitung lieferte 200 mg Rohprodukt, das sofort in 12 ml Eisessig gelöst wurde. Die Lösung wurde 20 Min. in N<sub>2</sub>-Atmosphäre auf 100° erhitzt, dann im Vakuum eingedampft. Die weitere übliche Aufarbeitung mit Chloroform ergab 185 mg Rohprodukt, das an 5,5 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert wurde. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 20 ml Lösungsmittel.

Die Fraktionen 1–4 (eluiert mit Be-Chf-(4:1)) gaben 1,9 mg amorphes Material; KEDDE-Reaktion negativ, verworfen.

Die Fraktionen 5–15 (31 mg eluiert mit Be-Chf-(1:1)) gaben aus Aceton-Äther 16,5 mg *3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidin (XXXI)* in Prismen vom Smp. 190–210°; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> = +147° ± 4° (c = 0,438; Chloroform). Beim weiteren Umkristallisieren zersetzt sich der Stoff. IR.-Spektrum (in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) Banden bei 2,78  $\mu$  (O–H); 5,59  $\mu$  und 5,72  $\mu$  (C=O, Butenolidring); 5,81  $\mu$  (anguläre Aldehydgruppe); 5,98  $\mu$  (A<sup>4</sup>-3-Keton) und 6,15  $\mu$  (C=C, Butenolidring). Nach Papierchromatogramm und IR.-Spektrum mit authent. Material identisch.

Die Fraktionen 16 und 17 (eluiert mit Chf) gaben 12,4 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 18–21 (41 mg, eluiert mit Chf) gaben aus Methanol 26 mg Kristalle vom Smp. 230–238°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther *3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidol (XXIX)* in Prismen vom Smp. 232–240°, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +83° ± 3° (c = 0,673; Methanol). UV.-Spektrum vgl. Fig. 7. IR.-Spektrum vgl. Fig. 12. Farbreaktionen mit 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: gelb (0 Min.), orange-gelb mit grünlichem Rand (1 Min.), orange-gelb (15 Min.), gelb (1–12 Std.). – Trocknung zur Analyse: 5 Std. bei 100° (OAB).

C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub> (386,48) Ber. C 71,48 H 7,82% Gef. C 71,06 H 8,07%

Die Fraktionen 22–28 (eluiert mit Chf-Me-(99:1), (98:2), (9:1) und (4:1)) ergaben 52 mg amorphes Material, das im Papierchromatogramm mehrere Flecke zeigt. Nicht weiter untersucht.

*Umsetzungen von weiteren Aglykonen und deren Abwandlungsprodukte mit Fusarium lini.* Die folgenden Stoffe wurden mit Kulturen von *F. lini*, genau wie bei Digitoxigenin (I) beschrieben, umgesetzt, aufgearbeitet und das Rohprodukt papierchromatographisch geprüft. In Klammern sind jeweils die eingesetzten Mengen, Reaktionszeit und Verweis auf Resultat bzw. Papierchromatogramm angegeben: Uzariogenin (XII) (5 mg; 24 Tage; Fig. 8); 3-Dehydro-uzariogenin (= Uzariogenin) (XII) (15 mg; 28 Tage; Fig. 8); Periplogenin (XX) (5 mg; 24 Tage; Fig. 11); 3-Dehydro-5-anhydro-periplogenin (XXVII) (5 mg; 15 Tage; Fig. 11).

Bei 3-Epi-digitoxigenin (VI), 3-O-Acetyl-4-anhydro-digitoxigenin (XV), 3-O-Acetyl-16-anhydro-gitoxigenin (XVI), Strophanthidol (XXI), Coroglaucigenin (XXII), Sarmentogenin (XXIII), 3-Dehydro-sarmentogenin (XXIV), 3,11-Bisdehydro-sarmentogenin (= Sarmentogenon) (XXV) und 3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidol (XXIX) war auch nach Reaktionszeiten von 24 Tagen keine merkliche Umsetzung festzustellen.

### III. Glykoside und O-Acetyl-glykoside

Von den freien Glykosiden wurden Aceton-Wasser-Lösungen und von den O-Acetyl-glykosiden Aceton-Lösungen steril zu den Kulturen gegeben und weiter, wie bei der Umsetzung von Digitoxigenin (I) beschrieben ist, behandelt und aufgearbeitet. Dabei wurde mit Chloroform, Chloroform-Alkohol-(4:1) und (2:1) ausgeschüttelt. Die eingedampften Rohextrakte wurden gewogen und im Papierchromatogramm geprüft und diesen Resultaten entsprechend weiter wie üblich an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Die erhaltenen Kristallisate wurden durch Mischprobe, Papierchromatogramm und Farbreaktion mit 84-proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mit authentischem Material verglichen und identifiziert. Zu den einzelnen Versuchen (vgl. Tab. 1) ist folgendes zu bemerken:

*Versuch Nr. 1:* Digitoxin (XXXII); blieb unverändert.

*Versuch Nr. 2:* 1. *Tetra-O-acetyl-digitoxin* (XXXIII) aus XXXII: 45 mg Digitoxin (XXII) wurden mit 1 ml abs. Pyridin und 0,4 ml Acetanhydrid 48 Std. bei 22° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 69 mg Rohprodukt, das im Papierchromatogramm nur einen Fleck gab (Rf-Wert: im System Benzol ges. Thioäthylenglykol/Aceton-Thioäthylenglykol-(3:1) auf Front). Es kristallisierte auch nach Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  bisher nicht.

2. 150 mg papierchromatographisch einheitliches amorphes XXXIII gab nach der Umsetzung 160 mg rohen Chloroform-Extrakt, der an 4,5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert wurde. Die Be-Chf-Gemische eluierten 42 mg amorphes XXXIII. Die Chf-Mc-Gemische eluierten 77 mg rohes *Digitoxin* (XXXII). Aus Aceton-Äther 26 mg reines XXXII in Prismen vom Smp. 247–250°.

*Versuch Nr. 3:* Evomonosid (XXXIV); blieb unverändert.

*Versuch Nr. 4:* 15 mg Tri-O-acetyl-evomonosid (XXXV) lieferten 13 mg Chloroformextrakt; daraus 5 mg rohes XXXV und aus Methanol-Äther 1,7 mg Evomonosid (XXXIV) vom Smp. 212–221°.

*Versuch Nr. 5:* Somalin (XXXVI) blieb unverändert.

*Versuch Nr. 6:* 25 mg Mono-O-acetyl-somalin (XXXVII) lieferten 35 mg Chloroformextrakt; davon aus Aceton-Äther 10 mg Somalin (XXXVI) vom Smp. 186–197°.

*Versuch Nr. 7:* 35 mg Echujin (XXXVIII) lieferten 59 mg Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt; davon aus Methanol-Äther 6 mg Somalin (XXXVI) vom Doppel-Smp. 105–111°/188–200°. Nach Umkristallisieren aus Methanol-Äther Nadeln vom Smp. 140–158°.

*Versuch Nr. 8:* 35 mg Hepta-O-acetyl-echujin (XXXIX) lieferten 39 mg Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt; davon aus Methanol-Äther 6 mg Somalin (XXXVI) vom Doppel-Smp. 127°/212–223°.

*Versuch Nr. 9:* 45 mg Di-O-acetyl-honghelosid A (XLII) lieferten 61 mg Chloroformextrakt, der statt an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  an  $\text{SiO}_2$  chromatographiert wurde. Es resultieren aus Aceton-Äther 20 mg Honghelosid  $\Lambda$  (XII) vom Smp. 187–207° und aus Aceton-Äther-Petroläther 1,1 mg 15-Desacetyl-honghelosid A (XL) vom Smp. 154–195°.

*Versuch Nr. 10:* 15 mg Hepta-O-acetyl-k-Strophanthosid (XLIV) lieferten 70 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt; davon aus Methanol-Äther 3 mg Cymarin XLVII vom Smp. 131–133°.

*Versuch Nr. 11:* 30 mg Tetra-O-acetyl-k-strophanthin- $\beta$  (XLVI) ergaben 43 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt; davon aus Methanol-Äther 4 mg Cymarin (XLVII) vom Smp. 129–131° sowie 6 mg einer amorphen Fraktion, die nach dem Papierchromatogramm nur k-Strophanthin- $\beta$  (XLV) enthielt.

*Versuch Nr. 12:* 20 mg Strophanthidin- $\beta$ -D-glucosid (XLVIII) ergaben 40 mg Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt; davon aus Methanol-Äther 7,5 mg Strophanthidin vom Doppel-Smp. 135–140°/198–201°.

*Versuch Nr. 13:* 20 mg Tetra-O-acetyl-strophanthidin- $\beta$ -D-glucosid (XLIX) lieferten 26 mg Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt; davon aus Methanol-Äther 6,5 mg Strophanthidin vom Smp. 133–135°.

Die Mikroanalysen verdanken wir den mikroanalytischen Laboratorien der SANDOZ AG., Basel (S) (Leitung: Dr. E. SCHÖNIGER), und der Organisch-chemischen Anstalt der Universität, Basel (OAB) (Leitung: E. THOMMEN).

### Zusammenfassung

Das Verhalten verschiedener digitaloider Aglykone und Glykoside gegenüber Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) wurde untersucht.

Digitoxigenin (I) ging durch 12 $\beta$ -Hydroxylierung in Digoxigenin (III) über. 3-O-Acetyl-digitoxigenin (II) ergab ebenfalls Digoxigenin (III). 3-Dehydro-digitoxigenin (= Digitoxigenon; VIII) lieferte 3-Epi-digitoxigenin (VI) (Reduktion der 3-Keto-gruppe zur äquatorialen Hydroxygruppe), 3-Dehydro-digoxigenin (IX) und 3-Epi-digoxigenin (X). IX und X sind neue Stoffe. IX wurde aus Digoxigenin (III) durch katalyt. Dehydrierung mit O<sub>2</sub> und Pt hergestellt. NaBH<sub>4</sub>-Reduktion von IX ergab 3-Epi-digoxigenin (X).

Bei Dihydro-digitoxigenin (XVII), Uzarigenin (XII), 3-Dehydro-uzarigenin (= Uzarigenon; XIII), Periplogenin (XX), 3-Dehydro-5-anhydro-periplogenin (XXVII) wurden papierchromatographisch neue Umwandlungsprodukte nachgewiesen, während 3-Epi-digitoxigenin (VI), 3-O-Acetyl-14-anhydro-digitoxigenin (XV), 3-O-Acetyl-16-anhydro-digitoxigenin (XVI), Strophanthidol (XXI), Coroglaucigenin (XXII), Sarmentogenin (XXIII), 3-Dehydro-sarmentogenin (XXIV) (erstmalig hergestellt), 3,11-Bisdehydro-sarmentogenin (XXV) und 3-Dehydro-5-anhydro-strophanthidol (XXIX) (erstmalig hergestellt) unverändert blieben.

Bei einer Anzahl von untersuchten Glykosiden und deren O-Acetyl-Derivaten wurde keine Hydroxylierung beobachtet. Hingegen wurden in den letzteren die Acetoxygruppen verseift sowie endständige  $\beta$ -glykosidisch gebundene D-Glucosereste abgespalten.

*F. lini* (BOLLEY) enthält somit mindestens 4 Enzymsysteme, nämlich eine 12 $\beta$ -Hydroxylase, eine Esterase, eine Hydrogenase und eine  $\beta$ -Glucosidase.

Organisch-chemische Anstalt der Universität, Basel

## 23. Synthesen auf dem Phenothiazin-Gebiet

3. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Neue Phenothiazinderivate

von J.-P. Bourquin, G. Schwarb, G. Gamboni, R. Fischer, L. Ruesch,  
S. Guldemann, V. Theus, E. Schenker und J. Renz

(15. XII. 58)

In unserer 1. und 2. Mitteilung haben wir Derivate des Phenothiazins beschrieben, die am Kohlenstoffatom 3 mit Mercaptogruppen substituiert waren<sup>2)</sup>. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Darstellung und Eigenschaften von Verbindungen, welche sowohl am Phenothiazin-Stickstoff als auch am C-3 dieses Ringgerüsts durch verschiedenartige Substitutionen gekennzeichnet sind.

<sup>1)</sup> 2. Mitteilung, Helv. 41, 1072 (1958).

<sup>2)</sup> 1. Mitteilung, Helv. 41, 1061 (1958). Vgl. die Hinweise auf die Bezifferung des Phenothiazin-Ringes.