

48. Umwandlung von Krötengiften (Bufadienoliden) durch Mikroorganismen:

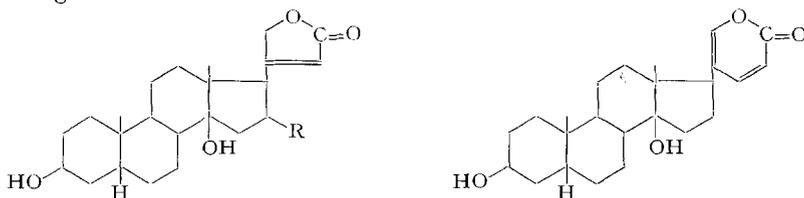
I. 12 β -Hydroxylierung von Bufalin¹⁾

5. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen²⁾

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

(24. I. 59)

Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) vermögen in den beiden digitaloiden Lactonen (Cardenoliden) Digitoxigenin (I) und Gitoxigenin (II) eine Hydroxylgruppe in die 12 β -Stellung einzuführen²⁾³⁾⁴⁾. Versuche mit weiteren Cardenoliden und einigen Abwandlungsprodukten hatten ergeben, dass diese Oxygenierungsreaktion praktisch nur bei diesen beiden Geninen stattfindet und sich somit durch eine relativ grosse Substratspezifität auszeichnet. Es schien uns interessant zu erfahren, ob und wie der Ersatz des an C-17 haftenden Butenolidrings durch den Cumalinring die Reaktionsfähigkeit der Enzyme von *F. lini* beeinflusst. Wir dehnten deshalb die Versuche auf die Krötengifte (Bufadienolide) aus und berichten über die Ergebnisse der Umsetzung von Bufalin (III) und 3-Dehydro-bufalin (= Bufalon) (VIII) mit dem genannten Organismus.



I (R = H): Digitoxigenin

II (R = OH): Gitoxigenin

III Bufalin

Bufalin (III) unterscheidet sich von Digitoxigenin (I) nur durch den Bau des Lactonrings an C-17. Es stellt den Grundtyp der Bufadienolide (Krötengifte) dar.

Diese Untersuchungen wurden durch das grosszügige Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. K. MEYER, Basel, ermöglicht, der uns grössere Mengen an Bufalin zur Verfügung stellte⁵⁾.

Die mikrobiologischen Versuche wurden genau gleich wie in den früheren Mitteilungen beschrieben²⁾⁴⁾ in Schüttelkulturen bei 25–27° durchgeführt. So lieferte Bufalin (III) nach einer Inkubationszeit von 11 Tagen ein krist. Reaktionsprodukt vom Smp. 240–246°. Nach dem UV.-Spektrum ($\lambda_{\max} = 300 \mu\mu$; $\log \epsilon = 3,76$) war der α -Pyroneering noch unversehrt. Im Papierchromatogramm verhielt es sich ein-

¹⁾ Aus der Dissertation von ALICE GUBLER, Basel 1959.

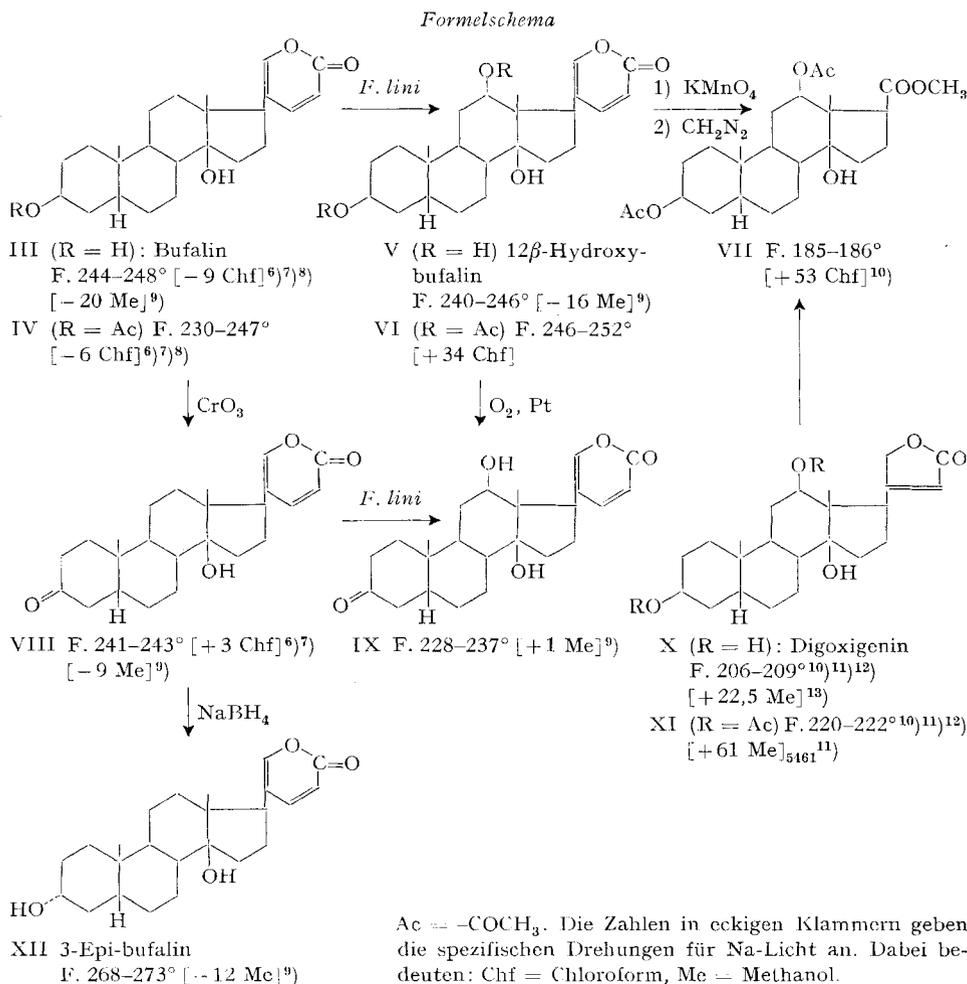
²⁾ 4. Mitt.: CH. TAMM & A. GUBLER, Helv. **42**, 239 (1959).

³⁾ A. GUBLER & CH. TAMM, Helv. **41**, 297 (1958).

⁴⁾ CH. TAMM & A. GUBLER, Helv. **41**, 1762 (1958).

⁵⁾ Wir möchten Herrn Prof. MEYER auch an dieser Stelle herzlich für seine freundliche Unterstützung danken.

heitlich (vgl. Fig. 1). Die Analysenwerte passten auf die Formel $C_{24}H_{34}O_5$. Bei der Behandlung mit Acetanhydrid und Pyridin bei 37° wurde ein Di-O-acetyl-Derivat der Formel $C_{28}H_{38}O_7$ erhalten, das gegen CrO_3 beständig war. Somit ist eine neue acetylierbare Hydroxylgruppe in die Bufalinmolekel eingetreten. Das Hydroxylierungsprodukt war mit keinem der bekannten Bufadienolide identisch. Zur Abklärung seiner Konstitution wurde das Di-O-acetyl-Derivat mit $KMnO_4$ in Aceton abgebaut.



⁶⁾ M. KOTAKE & K. KUWADA, Sc. Inst. phys. chem. Research (Tokio) **36**, 106 (1939); vgl. C. **1939**, II, 1681.

⁷⁾ K. MEYER, Pharmac. Acta Helv. **24**, 222 (1949).

⁸⁾ K. MEYER, Helv. **32**, 1238 (1949).

⁹⁾ Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

¹⁰⁾ S. PATAKI, K. MEYER & T. REICHSTEIN, Helv. **36**, 1295 (1953).

¹¹⁾ S. SMITH, J. chem. Soc. **1930**, 508.

¹²⁾ M. STEIGER & T. REICHSTEIN, Helv. **21**, 828 (1938).

¹³⁾ A. STOLL & W. KREIS, Helv. **16**, 1049 (1953).

Die sauren Anteile dieser Oxydation lieferten nach Behandlung mit Diazomethan einen krist. Methyl ester, der nach Smp., Misch-Smp., spez. Drehung und IR.-Spektrum (vgl. Fig. 4) mit dem bekannten 3 β ,12 β -Diacetoxy-14-hydroxy-5 β ,14 β -ätiansäure-methylester (VII) identisch war. VII wurde früher von REICHSTEIN *et al.*¹⁰⁾¹²⁾ beim Seitenkettenabbau von Di-O-acetyldigoxigenin (XI) erhalten. Das Hydroxylierungsprodukt des Bufalins besitzt somit die Konstitution des 12 β -Hydroxybufalins (3 β ,12 β ,14-Trihydroxy-bufadien-(20,22)-olid) (V). Seinem Di-O-acetyl-Derivat kommt die Formel VI zu. Mit dieser Zuordnung sind auch die molekularen Drehungsdifferenzen vereinbar; sie sind in Tab. 1 zusammengestellt. Wie bei Digitoxigenin (I) hat auch in Bufalin (III) eine 12 β -Hydroxylierung stattgefunden. Die Natur des Lactonrings an C-17 beeinflusst demnach weder Angriffspunkt im Sterinskelett noch Stereospezifität des hydroxylierenden Enzyms von *F. lini*.

In einem weiteren Versuch setzten wir 3-Dehydro-bufalin (= Bufalon) (VIII) mit *F. lini* um. Das rohe Reaktionsgemisch zeigte im Papierchromatogramm mehrere Flecken (vgl. Fig. 2). Die Auftrennung an Al₂O₃ ergab einen papierchromatographisch einheitlichen krist. Stoff vom Smp. 228–237° (Ausbeute ca. 10%) sowie ein Kristallisat vom Smp. 214–220° (Ausbeute ca. 2,5%).

Bei der erstgenannten Substanz vom Smp. 228–237° handelt es sich um das noch unbekannte 3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (3-Oxo-12 β ,14-dihydroxy-bufadien-(20,22)-olid) (IX). Dafür sprachen zunächst die R_f-Werte im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 2). Die Konstitution von IX wurde dann direkt dadurch bewiesen, dass 12 β -Hydroxybufalin (V) bei der Dehydrierung mit O₂ und Pt als Katalysator¹⁴⁾¹⁵⁾ einen Stoff lieferte, der mit dem auf mikrobiologischem Wege erhaltenen, nach Smp., Misch-Smp., spez. Drehung, R_f-Wert (vgl. Fig. 2) und IR.-Spektrum übereinstimmte.

Tabelle 1. Molekulare Drehungsbeiträge ($\Delta[M]_D$ -Werte) der 12 β -Hydroxygruppe in 14 β -Steroiden

Substanz	$[\alpha]_D$	$[M]_D$	$\Delta[M]_D$
12 β -Hydroxybufalin (V)	$-16^\circ \pm 2^\circ$ (Me) ⁹⁾	$-65^\circ \pm 8^\circ$	$+12^\circ \pm 16^\circ$
Bufalin (III)	$-20^\circ \pm 2^\circ$ (Me) ⁹⁾	$-77^\circ \pm 8^\circ$	
3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (VIII) .	$+1^\circ \pm 3^\circ$ (Me) ⁹⁾	$+4^\circ \pm 12^\circ$	$+30^\circ \pm 20^\circ$
3-Dehydro-bufalin (IX)	$-9^\circ \pm 2^\circ$ (Me) ⁹⁾	$-34^\circ \pm 8^\circ$	
Digoxigenin (X)	$+22,5^\circ \pm 2^\circ$ (Me) ¹³⁾	$+87,5^\circ \pm 8^\circ$	$+18^\circ \pm 16^\circ$
Digitoxigenin (I)	$+19^\circ \pm 2^\circ$ (Me) ¹⁶⁾	$+71,5^\circ \pm 8^\circ$	
3-Dehydro-digoxigenin	$+39^\circ \pm 3^\circ$ (Me) ²⁾	$+152^\circ \pm 12^\circ$	$+29^\circ \pm 20^\circ$
3-Dehydro-digitoxigenin	$+32^\circ \pm 2^\circ$ (Me) ¹⁷⁾	$+123^\circ \pm 8^\circ$	

¹⁴⁾ H. WIELAND, Ber. deutsch. chem. Ges. **45**, 484, 2606 (1912); **46**, 3327 (1913).

¹⁵⁾ 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. GUBLER²⁾³⁾⁴⁾.

¹⁶⁾ J. P. MATHIEU & A. PETIT, Tables de Constantes et Données Numériques 6. Pouvoir Rotatoire Naturel. I. Stéroïdes, Paris 1956.

¹⁷⁾ Dieser Wert wurde neu bestimmt. Der in der Literatur¹⁶⁾ angegebene Wert von $[\alpha]_D = +33^\circ \pm 2^\circ$ wurde in Chloroform bestimmt.

Da in Polyhydroxysteroiden unter diesen Bedingungen vorwiegend 3-ständige HO-Gruppen dehydriert werden¹⁵⁾, befindet sich in IX die Ketogruppe tatsächlich in 3-Stellung und die mikrobiologisch eingeführte HO-Gruppe in 12 β -Stellung. Somit hat auch in Bufalon (VIII) eine 12 β -Hydroxylierung stattgefunden. Dafür spricht auch der molekulare Drehungsbeitrag ($[\alpha]_D$ -Wert) dieses Hydroxyls (vgl. Tab. 1).

Papierchromatogramme¹⁸⁾

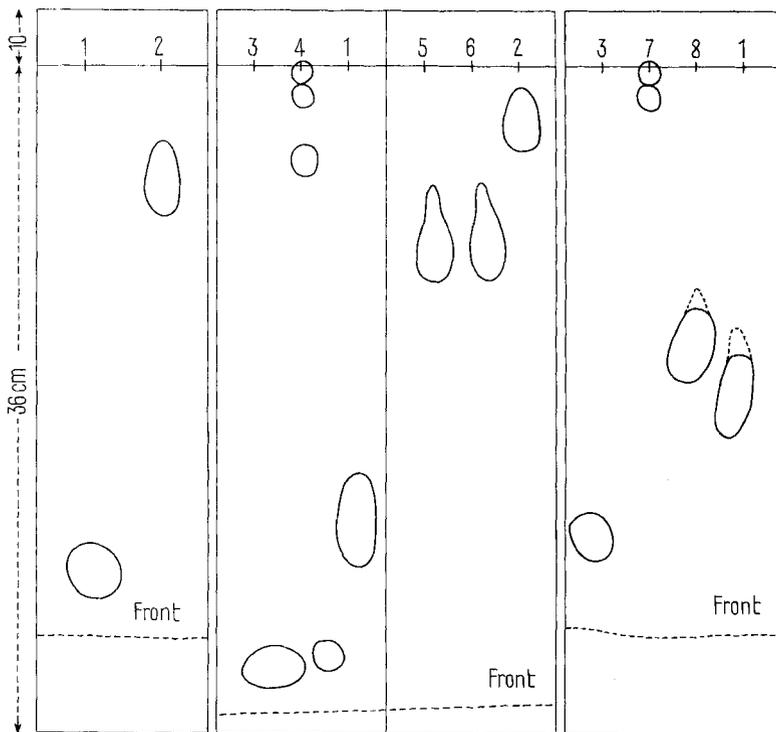


Fig. 1 Chf/Fmd; 3 Std. Fig. 2 Be-Chf-(7:5)/Fmd; 3 Std. Fig. 3 Be-Chf-(7:5)/Fmd; 2,5 Std.

- 1 = Bufalin (III)
- 2 = 12 β -Hydroxybufalin (V)
- 3 = 3-Dehydro-bufalin (= Bufalon) (VIII)
- 4 = Rohes Hydroxylierungsgemisch aus VIII mit *F. lini*
- 5 = 3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (IX), mikrobiologisch aus VIII
- 6 = 3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (IX) aus V
- 7 = Kristallinat vom Smp. 214–220°, mikrobiologisch aus VIII
- 8 = 3-Epi-bufalin (XII)

Das zweite Kristallinat vom Smp. 214–220° war nach den Papierchromatogrammen (vgl. Fig. 3) nicht einheitlich; es enthielt mindestens 2 Stoffe, die wegen der geringen Menge nicht getrennt und identifiziert wurden. Auf Grund der Rf-Werte

¹⁸⁾ 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 = Formamid.

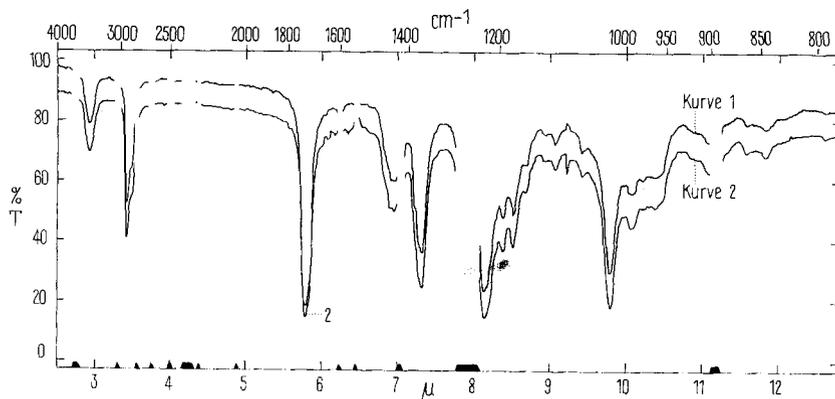


Fig. 4. IR.-Absorptionsspektren von $3\beta,12\beta$ -Diacetoxy-14-hydroxy- $5\beta,14\beta$ -ätiansäure-methylester (VII) in CH_2Cl_2 ¹⁹⁾

Kurve 1: Ester VII aus Abbau von VI: Lösung 0,052-m.; d = 0,2 mm

Kurve 2: Authentischer Ester VII: Lösung 0,061-m.; d = 0,2 mm

können aber Bufalin (III) wie auch 3-Epi-bufalin (XII) ausgeschlossen werden. Es ist überraschend, dass XII nicht erhalten wurde, denn in der analogen Umsetzung von 3-Dehydro-digitoxigenin mit *F. lini* hatte vorwiegend einfache Reduktion (ohne gleichzeitige Hydroxylierung) zu 3-Epi-digitoxigenin stattgefunden²⁾. 3-Epi-bufalin (XII) war noch unbekannt und wurde für diesen Vergleich durch Reduktion von 3-Dehydro-bufalin (VIII) mit NaBH_4 hergestellt²⁰⁾. Im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 3) lief XII (äquatoriale HO-Gruppe) etwas langsamer als das epimere Bufalin (III) (axiale HO-Gruppe)²¹⁾. 3-Epi-bufalin (XII) zeigte ebenfalls wie erwartet eine etwas stärkere Rechtsdrehung als Bufalin (III). Der $[\text{M}]_D^{\alpha-\beta}$ -Wert betrug $+31^\circ \pm 16^\circ$ (in Methanol)²²⁾.

Das Ergebnis der Toxizitätsbestimmung von 12β -Hydroxybufalin (V) (bestimmt²³⁾ an der Katze nach HATCHER-BRODIE) ist in Tab. 2 im Vergleich zu den Werten einiger bekannter Bufadienolide zusammengestellt.

Daraus geht hervor, dass 12β -Hydroxybufalin etwas wirksamer als die vier ersten Vergleichsstoffe ist, aber die hohe Wirksamkeit der drei letztgenannten nicht ganz erreicht.

¹⁹⁾ Aufgenommen von Herrn G. ROTZLER mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Spektrophotometer, Modell 21, mit NaCl-Prisma.

²⁰⁾ Zur Stereochemie der analogen NaBH_4 -Reduktion von 3-Oxo- 5β -Cardenoliden vgl. H. P. SIGG, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. **36**, 985 (1953). NaBH_4 greift unter diesen Bedingungen den Cumalinring nicht merklich an. Vgl. A. HUNGER & T. REICHSTEIN, Chem. Ber. **85**, 635 (1952).

²¹⁾ Analog verhalten sich die meisten 3α -Hydroxy- 5β -Steroide im Vergleich zu ihrem Epimeren mit β -ständigem Hydroxyl.

²²⁾ Berechnet aus den $[\text{M}]_D$ -Werten von XII = $-46^\circ \pm 8^\circ$ (in Methanol) und von III = $-77^\circ \pm 8^\circ$ (in Methanol). Der $\Delta[\text{M}]_D^{\alpha-\beta}$ -Wert von 3-Epi-digitoxigenin und Digitoxigenin beträgt $-30^\circ \pm 20^\circ$ (in Methanol); vgl. H. P. SIGG, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. **36**, 985 (1953). Die Drehungsunterschiede bei beiden Stoffpaaren stimmen somit miteinander bestens überein.

²³⁾ Die Prüfung wurde im pharmakologischen Laboratorium der SANDOZ AG, Basel, (Leitung Dr. A. CERLETTI) ausgeführt, wofür auch hier bestens gedankt sei.

Tabelle 2. Toxizität von 12 β -Hydroxybufalin (V) und einiger bekannter Bufadienolide

Substanz	Geometrisches Mittel der letalen Dosis (Katze) in mg/kg (= 1 Katzeinheit)
12 β -Hydroxybufalin (V)	0,084 ^{23a)}
Bufalin (III)	0,137 ⁷⁾⁸⁾
Telocinobufagin	0,101 ⁷⁾⁸⁾
Gamabufotalin	0,100 ⁷⁾⁸⁾
Scillarenin	0,125 ²⁴⁾
Scilliglaucosidin	0,064 ²⁵⁾
Scillirosidin	0,057 ²⁶⁾
Hellebrigenin	0,077 ²⁷⁾

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 zahlreichen Ratschläge bei der Züchtung der Mikroorganismen unseren besten Dank aussprechen.

Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber $\pm 3^\circ$. 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 P₂O₅ im Schweinchen bei der angegebenen Zeit und Temperatur getrocknet. Die Adsorptionschromatographien wurden nach der Durchlaufmethode²⁸⁾ mit neutralem Al₂O₃ der Aktivitätsstufe I der Fa. M. WOELM, Eschwege, Deutschland, durchgeführt. Zur Papierchromatographie wurde Papier WHATMAN Nr. 1 und als stationäre Phase Formamid²⁹⁾ (Imprägnieren mit Formamid-Aceton-(1:4) nach³⁰⁾) verwendet. Entwicklung der Papiere (nach Trocknung bei 80°) mit 20-proz. SbCl₃ in Chloroform³¹⁾. Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ nach Lit.³²⁾. Es bedeuten: Be = Benzol, Chf = Chloroform, Me = Methanol.

Kultur der Mikroorganismen. Fusarium lini (BOLLEY) wurde wie früher beschrieben²⁾ gezüchtet. Auch die Umsetzungen wurden analog zum beschriebenen Vorgehen²⁾ durchgeführt.

Umsetzung von Bufalin (III) mit F. lini. Eine Lösung von 230 mg III vom Smp. 235–244° in 43 ml Aceton wurde auf 43 100-ml-ERLENMEYER-Kolben (je 20 ml Nährlösung enthaltend) verteilt und 11 Tage bei 25–27° unter Belüftung auf der rotierenden Maschine (170 U/Min.) geschüttelt. Hierauf wurde die Nährlösung abgenutscht, das Mycel mit Chloroform und anschließend mit Alkohol gründlich nachgewaschen und ausgepresst. Das Filtrat wurde im Vakuum vom Alkohol weitgehend befreit und dreimal mit Chloroform und zweimal mit Chloroform-Alkohol (3:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 840 mg Rohprodukt, das an 8 g Al₂O₃ chromatographiert wurde. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 25 ml Lösungsmittel.

Die Fraktionen 1–5 (eluiert mit Be-Chf-Gemischen) gaben 539 mg Öl, SbCl₃-Reaktion negativ, verworfen.

^{23a)} Mittelwert aus 6 Infusionen. Fehlergrenze $\pm 3,5\%$.

²⁴⁾ A. STOLL, J. RENZ & A. BRACK, *Helv.* **34**, 2301 (1951).

²⁵⁾ A. STOLL, A. VON WARTBURG & J. RENZ, *Helv.* **36**, 1531 (1953).

²⁶⁾ A. STOLL & J. RENZ, *Helv.* **33**, 286 (1950).

²⁷⁾ J. SCHMUTZ, *Helv.* **32**, 1442 (1949).

²⁸⁾ T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Disc. Farad. Soc.* Nr. **7**, 305 (1949).

²⁹⁾ O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 108 (1951).

³⁰⁾ H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 357 (1953).

³¹⁾ D. LAWDAY, *Nature* **170**, 415 (1952); P. ZOLLER & CH. TAMM, *Helv.* **36**, 1744 (1953); H. R. URSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 883 (1955); R. BOLLIGER & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1659 (1957).

³²⁾ J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* **31**, 883 (1948).

Die Fraktionen 6–8 (61 mg, eluiert mit Be-Chf-(3:1)) gaben aus Aceton-Äther 27,3 mg *Bufulin* (III) vom Smp. 230–244°. Nach Misch-Smp. und Papierchromatogramm identisch mit authent. III.

Die Fraktionen 9–13 (eluiert mit Be-Chf-(1:1)) gaben 11,4 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 14–26 (139 mg, eluiert mit Be-Chf-(1:3), Chf und Chf-Me-Gemischen) gaben aus Aceton-Äther 121 mg Kristalle vom Smp. 228–238°. Nach Umkristallisieren aus Methanol-Äther, 12 β -Hydroxybufalin (3 β , 12 β , 14-Trihydroxy-bufadien-(20, 22)-olid) (V) in Prismen vom Smp. 240–246°. $[\alpha]_D^{24} = -16^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,251$ in Methanol). UV.-Spektrum in Alkohol³³): $\lambda_{\max} = 300 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,76$) ber. auf $C_{24}H_{34}O_5$. Rf-Wert vgl. Fig. 1 und 2. Farbreaktion mit 84-proz. H_2SO_4 : grün-gelb (0 Min.), grün-gelb mit dunkelgrüner Randzone (2 Min.), gelb mit dunkelgrüner Randzone (5 Min.), braun mit grüner Randzone (30 Min.), braun (2 Std.). Trocknung zur Analyse 5 Std. bei 120°.

$C_{24}H_{34}O_5$ (402,51) Ber. C 71,6 H 8,5 O 19,9% Gef. C 71,1 H 7,9 O 20,2; 20,1%

Di-O-acetyl-Derivat VI (3 β , 12 β -Diacetoxy-14-hydroxy-bufadien-(20, 22)-olid). 50 mg 12 β -Hydroxybufalin (V) vom Smp. 240–246° wurden mit 1 ml abs. Pyridin und 0,8 ml Acetanhydrid 2 Tage bei 20° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chloroform, Waschen dieser Lösung mit 2-n. HCl, 2-n. Na_2CO_3 und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten 75 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 49 mg Kristalle vom Smp. 245–251°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther rechteckige Blättchen vom Smp. 246–252°. $[\alpha]_D^{23} = +34^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,227$ in Chloroform). Farbreaktion mit 84-proz. H_2SO_4 : hellgelb (0 Min.), grüngelb (2 Min.), hellgrün (30 Min. bis 1 Std.), farblos (bis 5 Std.).

*Abbau von VI mit $KMnO_4$ zum 3 β , 12 β -Diacetoxy-14-hydroxy-5 β , 14 β -ätiansäure-methylester (VII)*³⁴). Eine Lösung von 46 mg VI vom Smp. 241–252° in 3 ml Aceton (frisch über $KMnO_4$ destilliert) wurde innerhalb 3,5 Std. portionsweise mit insgesamt 80 mg fein gepulvertem $KMnO_4$ versetzt, wobei das Reaktionsgemisch geschüttelt wurde. Nach einer weiteren Std. war die Lösung noch violett gefärbt. Hierauf wurde das Aceton im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 3 ml Wasser versetzt und das ausgefällte MnO_2 durch Einleiten von SO_2 reduziert³⁵). Die wässrige saure Lösung wurde mit Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformlösung mit wenig Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Es resultierten 37 mg saure Anteile als farblos-schaum. Sie wurden sofort in 2 ml Äther-Chloroform-(1:1) gelöst und mit ätherischem Diazomethan versetzt. Nach 15 Min. wurde eingedampft und der Rückstand (40 mg) an 1,2 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Benzol eluierten Fraktionen (11 mg) gaben aus Äther-Petrol-äther 7 mg Kristalle vom Smp. 176–183°. Nach Umkristallisieren Blättchen vom Smp. 181–183°. $[\alpha]_D^{25} = +56,5^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,535$, in Chloroform³⁶). Mischprobe mit authent. Material schmolz gleich. IR.-Spektrum vgl. Fig. 4.

Umsetzung von 3-Dehydro-bufalin (= Bufulon) (VIII) mit F. lini: 3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (3-Oxo-12 β , 14-dihydroxy-bufadien-(20:22)-olid) (IX) und Mischkristallisat vom Smp. 214–220°. Eine Lösung von 100 mg VIII vom Smp. 220–228° in 20 ml Aceton wurde, genau wie bei Bufulin (III) beschrieben, während 12 Tagen mit den Kulturen von *F. lini* geschüttelt, dann analog aufgearbeitet. Es resultierten 150 mg Rohprodukt, das an 4 g Al_2O_3 chromatographiert wurde, vgl. Tab. 3. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 10 ml Lösungsmittel.

Fraktion 9–12: 3-Dehydro-bufalin (VIII) vom Smp. 212–217°. Nach Mischprobe und Papierchromatogramm identisch mit authent. VIII.

Fraktion 19 und 20: 3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (3-Oxo-12 β , 14-dihydroxy-bufadien-(20, 22)-olid) (IX) in Pyramiden vom Smp. 228–237°. $[\alpha]_D^{27} = +1^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,607$ in Methanol). Papierchromatogramm vgl. Fig. 2. Farbreaktion mit 84-proz. H_2SO_4 : blassgelb (0 Min.), grün-gelb mit grüner Randzone (1 Min.), braun-grün (7 Min.), braun mit grüner Randzone (15 Min.), schmutzig-grün (25 Min.), dunkelgrün (35 Min. bis 1 Std.), braun (5 Std.).

Fraktion 22–24: Kristallisat vom Smp. 214–220°. Papierchromatogramm vgl. Fig. 3.

³³) Aufgenommen von Herrn G. ROTZLER mit einem Unicam SP 500-Spektrophotometer mit Sekundär-Elektronenvervielfacher.

³⁴) Zur Methodik vgl. J. SCHMUTZ, Helv. **32**, 1449 (1949).

³⁵) Modifikation nach J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, Helv. **41**, 2121 (1958).

³⁶) S. PATAKI *et al.*¹⁹) fanden den Smp. 185–186° und $[\alpha]_D^{21} = +53,2^\circ \pm 1^\circ$ (in Chloroform).

Tabelle 3. Chromatogramm von 150 mg Umwandlungs-Rohprodukt von Bufalon

Fr.	Lösungsmittel	Eluat	
		roh in mg	Eigenschaften, Identifiz. etc.
1-6	Be und Be-Chf-(9:1)	31,5	SbCl ₅ -Reaktion negativ, verworfen
7-8	Be-Chf-(9:1)	1,5	amorph
9-12	Be-Chf-(85:15)	8,4	aus Aceton-Äther 4 mg VIII, Smp. 212-217°
13-18	Be-Chf-(1:1)	4,6	amorph
19-20	Be-Chf-(1:3)	14,5	aus Aceton-Äther 9 mg IX, Smp. 228-237°
21	Be-Chf-(1:3)	4,0	amorph
22-24	Be-Chf-(1:3) und Chf	2,9	aus Aceton-Äther 2,2 mg Krist. Smp. 214-220°

3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (IX) aus 12 β -Hydroxybufalin (V). Eine Suspension von 10 mg PtO₂, H₂O in 3 ml bidest. Wasser wurde 1 Std. bei 22° in H₂-Atmosphäre geschüttelt. Hierauf wurde eine Lösung von 25 mg V vom Smp. 240-246° in 4 ml Aceton und 2 ml bidest. Wasser zugegeben und 24 Std. bei 22° in O₂-Atmosphäre geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Pt und Nachwaschen mit Aceton wurde das Filtrat von Aceton befreit und die wässrige Suspension mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Trocknen mit Na₂SO₄ und Eindampfen resultierten 36 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 21 mg Kristalle vom Smp. 216-228°. Sie enthielten nach dem Papierchromatogramm noch eine Spur Ausgangsmaterial IX. Die Kristalle wurden deshalb in wenig Chloroform gelöst und auf 5 Papierbogen (je 17 cm breit) aufgetragen und im System Chloroform/Formamid (2 Std., Front nicht abgetropft) getrennt. Die substanzhaltigen Papierzonen wurden ausgeschnitten und mit Methanol extrahiert. Die Lösungen wurden eingedampft, der Rückstand zwischen Chloroform und Wasser verteilt, die Chloroformlösung über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierte so durch Kristallisation aus Aceton-Äther 14 mg reines *3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (IX)* vom Smp. 229-237°. Nach Mischprobe, Papierchromatogramm (vgl. Fig. 2), Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄ und IR.-Spektrum identisch mit IX, das mikrobiologisch aus VIII gewonnen worden war.

3-Epi-bufalin (XII) aus VIII. Eine Lösung von 50 mg *3-Dehydro-bufalin (VIII)* vom Smp. 210-225° in 5,5 ml Dioxan-Wasser-(4:1) wurde mit einer Lösung von 30 mg NaBH₄ in 0,6 ml Dioxan-Wasser versetzt und 2 Std. bei 20° stengelassen. Hierauf wurden weitere 20 mg NaBH₄ gelöst in 0,4 ml Dioxan-Wasser-(3:1), zugegeben und 4 Std. stengelassen. Dann wurde bei 0° mit 2-n. H₂SO₄ bis zur gerade kongosauren Reaktion versetzt, das Dioxan im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt. Der nach Eindampfen erhaltene Rückstand wurde mit 10 ml Methanol, 10 ml 0,1-n. H₂SO₄ und 200 mg D-Mannit 30 Min. unter Rückfluss erhitzt. Nach Abdampfen des Methanols wurde mit Chloroform ausgeschüttelt, die Lösungen mit 2-n. Na₂CO₃ und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten 58 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 24 mg Kristalle vom Smp. 253-256°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther, Platten vom Smp. 268-272°. $[\alpha]_D^{25} = -13^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,480 in Methanol) und $[\alpha]_D^{26} = -12^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,933 in Methanol). Farbreaktion mit 84-proz. H₂SO₄: blassgelb (0 Min.), gelb (4 Min.), gelb mit grau-violetter Randzone (10 Min.), violett mit hellblauer Randzone (20-30 Min.), blaugrün (50 Min. bis 2 Std.). Trocknung zur Analyse 5 Std. bei 120°.

C₂₄H₃₄O₄ (374,51) Ber. C 73,7 H 9,1 O 17,2% Gef. C 73,1 H 8,4 O 17,9%

Spezifische Drehungen:

Bufalin (III): $[\alpha]_D^{26} = -20^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,325 in Methanol).

3-Dehydro-bufalin (= Bufalon) (XI): $[\alpha]_D^{24} = -9^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,095 in Methanol).

3-Dehydro-digitoxigenin (= Digitoxigenon): $[\alpha]_D^{23} = +32^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,456 in Methanol).

Die Mikroanalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium der SANDOZ AG., Basel (Leitung: Dr. E. SCHÖNIGER).

Zusammenfassung

Bufalin (III) wurde durch 12 β -Hydroxylierung mit Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) in 12 β -Hydroxybufalin (V) übergeführt, dessen Konstitution durch Abbau zum bekannten 3 β ,12 β -Diacetoxy-14-hydroxy-5 β ,14 β -ätiansäure-methylester (VII) bewiesen wurde. 3-Dehydro-bufalin (= Bufalon) (VIII) lieferte beim Umsatz mit *F. lini* 3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (IX) sowie ein Mischkristallisat von 2 weiteren, nicht identifizierten Stoffen. IX wurde auch aus V durch katalytische Dehydrierung mit O₂ und Pt bereitet. NaBH₄-Reduktion von IX ergab 3-Epi-bufalin (XII), das mikrobiologisch nicht gebildet wurde.

Organisch-chemische Anstalt der Universität, Basel

49. Über die Kohlenoxyd-Hydrierung an Rutheniumkatalysatoren

3. Mitteilung

Kohlenoxyd-Hydrierung zwischen 100 und 2000 at¹⁾

von P. Guyer, D. Thomas und A. Guyer

(24. I. 59)

Im Rahmen von Studien über die Kohlenoxyd-Hydrierung nach FISCHER-TROPSCH gelang es, durch Wahl von ganz reinem, mit Wasserstoff vorbehandeltem Ruthenium die Synthese so zu lenken, dass fast ausschliesslich feste, hochmolekulare Kohlenwasserstoffe anfielen²⁾, und es konnte ein Zusammenhang zwischen der Mikrostruktur eines Rutheniumkatalysators, wie sie mit Hilfe der Tieftemperatur-Stickstoffadsorptions-Methode bestimmt wird, und seiner Selektivität nachgewiesen werden³⁾. Für die Synthese hochmolekularer Produkte sind grosse Poren von Vorteil. Mit der dadurch bedingten Oberflächenverminderung war jedoch eine beträchtliche Erniedrigung des Gasumsatzes verbunden.

Während bereits aus den Versuchen von PICHLER⁴⁾ bekannt war, dass eine Erhöhung des Druckes und der damit verbundenen Verlängerung der Verweilzeit bei der Hydrierung eine Steigerung des Gasumsatzes und des prozentualen Anteils an Festparaffin zur Folge hat, wurde bisher noch nie der spezifische Einfluss des Druckes allein, d. h. unter Konstanthaltung der Kontaktzeit, auf Umsatz und Selektivität untersucht; PICHLER hatte immer gleiche Endgasgeschwindigkeit, und bei Steigerung des Druckes somit längere Verweilzeit.

In der hier referierten Arbeit wurden nun Untersuchungen über die kontinuierliche Kohlenoxyd-Hydrierung an Ruthenium bei 100 bis max. 2000 at durchgeführt, die dazu beitragen sollten, unter Beachtung der gegenseitigen Wechselwirkungen den spezifischen Einfluss von Druck, Temperatur und Verweilzeit auf den Synthese-

¹⁾ Vortrag an der Sommersversammlung der Schweiz. Chem. Gesellschaft in Glarus am 13./14. September 1958 (gekürzte Fassung).

²⁾ A. GUYER, P. GUYER, F. SCHNEIDER & H. R. MARFURT, *Helv.* **38**, 798 (1955).

³⁾ A. GUYER, J. JUTZ & P. GUYER, *Helv.* **38**, 971 (1955).

⁴⁾ H. PICHLER & H. BUFFLEB, *Brennstoff-Chemie* **21**, 257 (1940).