

79. Die Biosynthese des Digitoxigenins, Herkunft des C-20

Glykoside und Aglykone, 253. Mitteilung¹⁾

von J. v. Euw und T. Reichstein

(3. II. 64)

Für die Biosynthese des Cholesterols (IV) aus Acetat ist der Weg über Mevalonsäure (I)³⁾, Squalen (II)⁴⁾ und Lanosterol (III)]5] gut gesichert [5] [6]. Prinzipiell derselbe Weg ist für die Biosynthese zahlreicher anderer tierischer und pflanzlicher Steroide, sowie der Terpene und Carotinoide vorgeschlagen [4b] [6] und teilweise bewiesen worden [6] (höhere Pflanzen vgl. [7]). Gallensäuren (C₂₄-Steroide) entstehen – soweit bekannt – ausschliesslich durch Abbau aus Cholesterol [6] [8]; auch die Bufadienolide der Kröten (ebenfalls C₂₄-Steroide) entstehen aus Cholesterol, wie von SIPERSTEIN, MURRAY & TITUS [9] für *Bufo marinus* gezeigt wurde; dasselbe gilt weitgehend für Progesteron [6] und wenigstens zum Teil für die Pregnanderivate der Nebennierenrinde [10]⁵⁾.

Es war daher zu vermuten, dass gleiches auch für die Biosynthese der Cardenolide zutrifft. In Übereinstimmung mit dieser Annahme zeigten RAMSTAD & BEAL [11], dass Pflanzen von *Digitalis lanata* nach Injektion von DL-Mevalonsäure-[2-¹⁴C] (DL-Form von I) radioaktives Lanatosid-A produzieren. Die Aktivität des letzteren war ganz im Digitoxigenin enthalten, die Zucker (Glucose und Digitoxose) waren inaktiv. Kurz darauf beschrieben GREGORY & LEETE [12] einen ganz analogen Versuch mit *Digitalis purpurea* (auch ganze Pflanzen). Sie isolierten das Digitoxigenin (VII) und konnten durch Abbau zeigen, dass es im Butenolidring *keine* Radioaktivität enthielt. Dies war überraschend. Wäre das Digitoxigenin (VII) nach dem Schema I → II → III → VII entstanden und würden dabei alle 23 C-Atome von der Mevalonsäure stammen, so wäre Aktivität an den C-Atomen Nr. 1, 7, 15 und 22 zu erwarten, wobei C-22 etwa $\frac{1}{4}$ der Totalaktivität hätte enthalten müssen. GROS & LEETE [13] zeigten ferner kürzlich, dass analog (diesmal durch abgeschnittene Blätter von *Digitalis purpurea*) synthetisiertes Digitoxigenin tatsächlich an C-15 markiert war, und dass dieses C-Atom ca. $\frac{1}{3}$ der totalen Aktivität enthielt. Dies spricht stark dafür, dass wenigstens die 19 C-Atome des Sterinkerns aus Mevalonsäure (I) via Squalen (II) gebildet wurden. GREGORY & LEETE [12] zeigten ferner, dass nach Verabreichung von Na-Acetat-[1-¹⁴C] radioaktives Digitoxigenin erhalten wurde, das an C-20 und C-23 radioaktiv war, während sich C-21 und C-22 als inaktiv erwiesen. Die bisherigen Resultate zeigen, dass die C-Atome 22 und 23 nicht aus Mevalonsäure stammen, sie

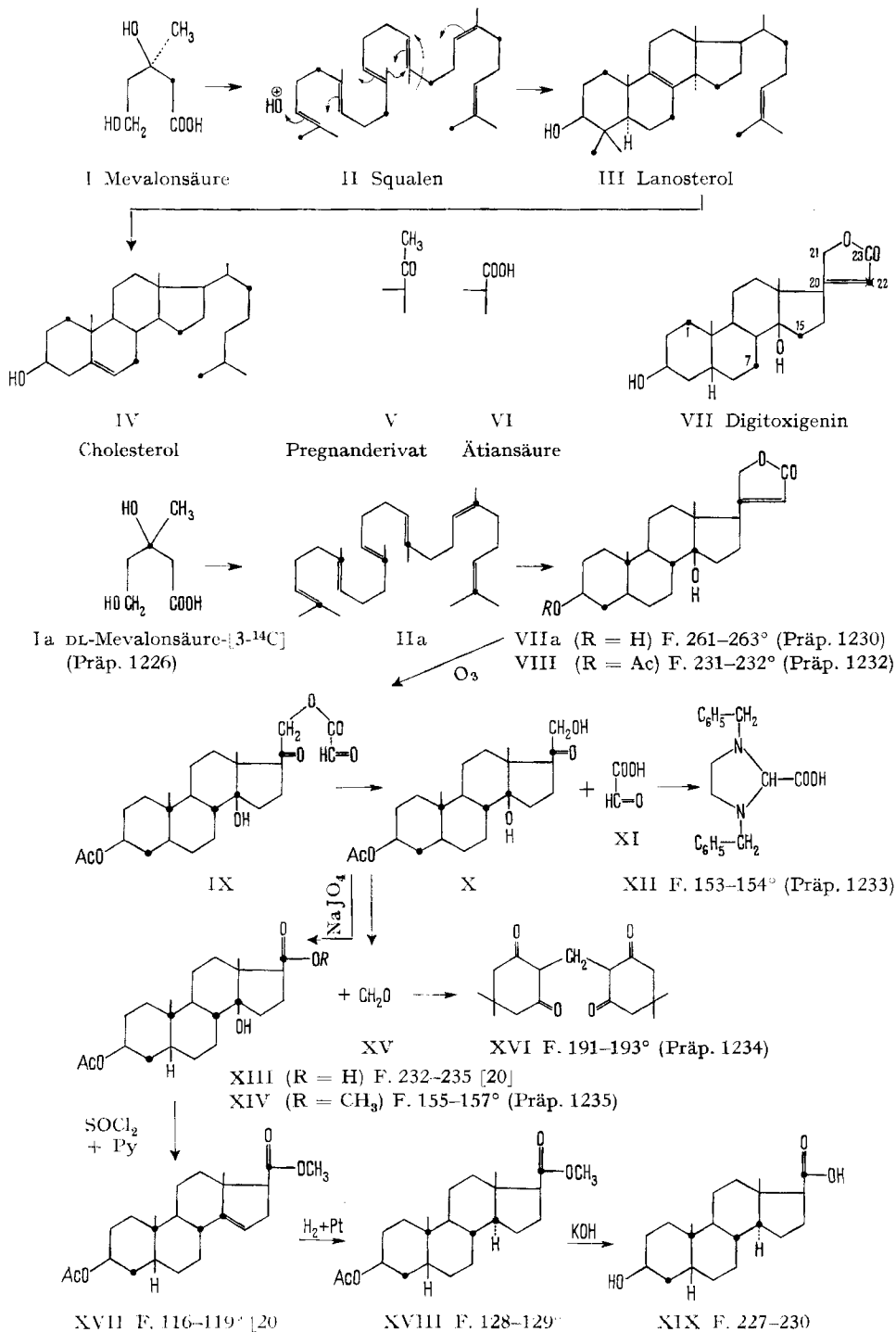
¹⁾ 252. Mitteilung s. [1]²⁾.

²⁾ Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 723.

³⁾ Absolute Konfiguration vgl. [2]. Synthese beider optisch aktiver Formen aus (+)- und (-)-Linalool vgl. [3].

⁴⁾ Cyclisierung vgl. [4].

⁵⁾ Herr Dr. S. LIEBERMAN (briefliche Mitteilung) glaubt, dass die Biosynthese aller steroiden Hormone im tierischen und menschlichen Organismus über Cholesterol verläuft; ein wirklich strenger Beweis dafür existiert aber nicht.



sagen aber über die Herkunft von C-20 und C-21 nichts aus. Diese Befunde sind nach GREGORY & LEETE mit einer Bildung des Digitoxigenins (VII) aus einer Ätiansäure VI und den Elementen von 2 Mol. Essigsäure vereinbar, wie sie von TSCHESCHE [14] vorgeschlagen wurde. Die genannten Autoren machen aber bereits darauf aufmerksam, dass möglicherweise auch die C-Atome Nr. 20 und 21 aus Mevalonsäure stammen könnten, und dass ein 20-Oxo-pregnanderivat V die unmittelbare Vorstufe bei der Biosynthese des Digitoxigenins sein könnte. Diese Vorstufe würde nur 1 Mol. fremde Essigsäure zum Aufbau des Cardenolidringes benötigen. Für den zweiten Weg sprechen auch phytochemische Befunde wie sie TSCHESCHE [15] diskutierte.

Zur Abklärung dieser Frage haben wir das Ammoniumsalz von Mevalonsäure-[3-¹⁴C] (Ia) bereitet und dieses (19 mg mit total 0,256 mC = 568320000 dpm) an 19 junge Pflanzen von *Digitalis lanata* EHRH.⁶⁾ verabreicht (vgl. Exper. Teil). Nach 21 Tagen⁷⁾ wurden die Blattrosetten kurz über den Wurzeln abgeschnitten (total 275 g Blätter mit Stengeln) und die oberirdischen Teile sofort bei ca. 40–50° getrocknet und gepulvert. Das trockene Pulver (85 g) gab nach Weichen mit Wasser (Fermentierung) und üblicher Aufarbeitung (mit Reinigung mit Pb(OH)₂)⁸⁾ die in Tab. 1 genannten Ausbeuten an Rohextrakten.

Tabelle 1. Ausbeute an Rohextrakten aus 85 g getrockneten Blättern von *Digitalis lanata* nach Verabreichung von total 0,256 mC Mevalonsäure-[3-¹⁴C]-Ammoniumsalz (= 568320000 dpm)

Art des Extraktes	Menge in g	Radioaktivität pro mg	in dpm total
Petroläther-	0,86	6540	5624000
Chloroform-	3,5	8210	28735000
Chloroform-Alkohol-(2:1)-	0,81	9630	7800000
Chloroform-Alkohol-(3:2)-	1,27	12000	15240000
Total			57399000

Der Chloroform-Extrakt wurde einer milden sauren Hydrolyse [17] unterworfen. Die dabei erhaltenen rohen Genine gaben nach Chromatographie an Al₂O₃:

115 mg krist. Digitoxigenin (Präp. Nr. 1230) mit 9500 dpm/mg entspr. 3560000 dpm/mMol bzw. total 1090000 dpm;

27 mg krist. Gitoxigenin (Präp. Nr. 1231) mit 8900 dpm/mg, entspr. 3480000 dpm/mMol bzw. total 240000 dpm.

Beide Genine waren nach Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie einheitlich. Das Digitoxigenin wurde acetyliert und das krist. O-Acetylderi-

⁶⁾ Hierzu dienten kultivierte Pflanzen eines ausgesuchten Stammes («A-Pflanzen»), die vorwiegend Digitoxigeninglykoside und fast keine Digoxigeninglykoside produzieren. Sie wurden uns von der Direktion der Firma SANDOZ-AG., Basel, in der Versuchsgärtnerei dieser Firma im Klushof zur Verfügung gestellt. Wir möchten der Firma SANDOZ sowie besonders den Herren Dr. J. RUTSCHMANN und Dr. E. ANGLIKER auch hier für ihre Hilfe bestens danken, ebenso Herrn P. ACHERMANN für die gärtnerische Betreuung der Pflanzen.

⁷⁾ Diese Zeitspanne war offensichtlich etwas zu lang und hat vermutlich dazu geführt, dass auch in «falschen» C-Atomen (C-21 sowie C-22-23) eine geringe Aktivität gefunden wurde, was vielleicht durch Rückreaktionen verursacht wird.

⁸⁾ Methodik vgl. [16].

vat (VIII, Präp. Nr. 1232, 120 mg) dem Ozonabbau [18] unterworfen. Der erhaltene Glyoxylsäure-ester IX⁹⁾ wurde wie üblich [19] mit KHCO_3 in wässrigem Methanol verseift, worauf neben dem krist. Ketol X die Glyoxylsäure (XI) isoliert und als krist. Derivat mit *sym.*-N,N-Dibenzyl-diäthylamin, das wahrscheinlich die Struktur XII besitzt, isoliert. Abbau des Ketols X in wässrigem Dioxan¹⁰⁾ lieferte neben der Ätiansäure XIII [20] Formaldehyd (XV), der als krist. Dimedonderivat XVI isoliert wurde. Um bei der anschliessenden SCHMIDT-Reaktion [21] eine Lactonbildung [22] der Säure XIII sowie fremdes CO_2 aus der Acetoxylgruppe auszuschalten, haben wir die Säure XIII mit CH_2N_2 in den krist. Methylester XIV (Präp. 1235) übergeführt. Dann wurde mit SOCl_2 und Pyridin [23]¹¹⁾ Wasser abgespalten und der entstandene ungesättigte Ester XVII [20] zum gesättigten Ester XVIII [20] [26] hydriert. Energetische Verseifung lieferte die krist. 3 β -Hydroxyätiansäure (XIX) (48 mg), die dem SCHMIDT-Abbau durch Erwärmen mit konz. H_2SO_4 und NaN_3 in frisch gereinigtem Chloroform unterworfen wurde. Das entstandene CO_2 wurde als BaCO_3 (26,3 mg Präp. 1236) isoliert. Über die gefundenen Aktivitäten orientiert Tabelle 2).

Diskussion der Resultate. – Die gefundenen Werte zeigen eindeutig, dass C-Atom Nr. 20 aus Mevalonsäure stammt. Das BaCO_3 (Präp. 1236) zeigte jedoch eine merklich zu geringe Aktivität, nämlich spezifisch nur 76,5 % und total nur 68 % der theoretisch zu erwartenden Menge. Dies dürfte zwei Gründe haben.

a) In Vorversuchen war es uns nicht möglich, bei der SCHMIDT-Reaktion einen erheblichen Blindwert ganz auszuschalten. Durch Arbeiten in reinem N_2 , Reinigung des NaN_3 und Reinigung des Chloroforms unmittelbar vor jedem Versuch konnte er merklich herabgesetzt, aber nie ganz auf 0 gebracht werden. Daher haben wir auch die Totalmenge an Aktivität bestimmt. Diese gibt aber nur einen Minimalwert, weil die SCHMIDT-Reaktion nicht zu 100 % verläuft. Zum Vergleich wurde eine ungefähr äquivalente Menge Cyclohexancarbonsäure-[7-¹⁴C] unter gleichen Bedingungen dem SCHMIDT-Abbau unterworfen und die Radioaktivität des entstandenen BaCO_3 bestimmt (Tab. 2). Die Totalausbeute betrug hier ca. 95 %, gleichzeitig liess sich eine merkliche Verdünnung durch fremdes CO_2 feststellen¹²⁾, spez. Aktivität nur 64,5 % der Theorie.

b) Aus den Zahlen geht weiter hervor, dass die C-Atome Nr. 21, 22 und 23 in unserem Versuch nicht völlig inaktiv waren, sondern auch eine geringe Markierung erhalten hatten. Wir glauben, dass dies auf Rückreaktionen bei der relativ langen Ein-

⁹⁾ Nach ZINGG & MEYER [18b] wird bei der reduktiven Spaltung des Ozonids der Glykolsäure ester erhalten. Dies scheint von den Bedingungen abhängig zu sein. Wir reduzierten nach JUSLÉN *et al.* [18c] mit Zn-Staub in Gegenwart von Wasser bei 0° und erhielten nur Glyoxylsäure (XI). Glykolsäure gibt mit *sym.*-N,N-Dibenzyl-diäthylamin ein krist. Salz der Zusammensetzung $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{N}_2$ vom Smp. 119–120°, das sich von XII leicht unterscheiden lässt.

¹⁰⁾ Dioxan ist als Lösungsmittel für den Abbau mit NaJO_4 nicht günstig, weil es die Reaktion stark zu verzögern scheint und die Aufarbeitung etwas erschwert. Es hatte aber den Vorteil, im Blindversuch keinen Formaldehyd zu bilden, während aus Methanol sowie aus Tetrahydrofuran auch nach vielen Reinigungsversuchen immer erhebliche Mengen von Formaldehyd entstanden.

¹¹⁾ Die Wasserabspaltung mit SOCl_2 + Pyridin nach DARZENS [24] verläuft sehr viel rascher und glatter als diejenige mit POCl_3 + Py [20], vgl. dazu [25].

¹²⁾ Die SCHMIDT-Reaktion verläuft bei Cyclohexancarbonsäure bereits bei ca. 40°, also merklich leichter als bei XIX, wo längere Zeit auf 50° erwärmt werden musste, um sie zu beenden.

Tabelle 2. *Gefundene Radioaktivität¹³⁾ des O-Acetyl-digitoxigenins (VIII) und der daraus erhaltenen Abbauprodukte*

Präp. Nr.	Stoff	Mol-Gew.	Gefundene Radioaktivität (in Klammern berechnete)		
			dpm/mg	dpm/mMol	total
1232	O-Acetyl-digitoxigenin (VIII)	416,57	8880	3699000	
1233	Glyoxylsäurederivat XII	296,38	130	38000	
1234	Formaldehyd-dimedon XVI	292,38	71	20760	
1235	Ätiansäure-ester XIV	392,52	8920	3501000	
	Eingesetzte Ätiansäure XIX (48 mg)	320,46	(10937) ¹⁴⁾	(3501000) ¹⁴⁾	523800
	davon 1/5 für C-20 berechnet =			(700000)	(104760)
1236	BaCO ₃ aus XIX total 26,3 mg statt ber. 29,6 mg	197,4	2710	535000	71300 (104760) ¹⁵⁾
1237	Cyclohexancarbonsäure- [7- ¹⁴ C] (25 mg)	128,17	1100	141000	27500
1238	BaCO ₃ aus 1237 total 56,2 mg statt ber. 38,4 mg	197,4	464	91000	26060 (27500)

wirkung (21 Tage) in der Pflanze beruht¹⁶⁾. Nimmt man an, dass in der Ätiansäure XIX die nicht durch fette Punkte hervorgehobenen C-Atome Nr. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18 und 19 (total 15 Stück) eine ungefähr gleich starke Aktivität wie die erwähnten C-Atome Nr. 21, 22 und 23 enthalten hatten, also ca. 20000 dpm/mMol pro C-Atom, so ergibt sich für diese 15 C-Atome total 300000 dpm/mMol = 8,5% der total in der Ätiansäure XIX enthaltenen Menge. Es wären dann in den 5 hervorgehobenen C-Atomen Nr. 4, 10, 8, 14 und 20 somit nur ca. 91,5% der in XIX gefundenen Menge zu erwarten, das sind ca. 3200000 dpm/mMol und am C-20 somit ca. 640000 dpm/mMol, ber. für die eingesetzten 48 mg total ca. 96000 dpm.

Ogleich mit diesen Befunden ein direkter Beweis für die Herkunft des C-Atoms Nr. 21 in Digitoxigenin (VII) noch nicht erbracht ist, kann nach den Befunden von GREGORY & LEETE [12] mit markierter Essigsäure kaum daran gezweifelt werden, dass auch dieses aus der Mevalonsäure stammt. Damit ist die Herkunft der C-Atome entsprechend XX + XXI → XXII bewiesen. Es wird zudem sehr wahrscheinlich, dass diese Biosynthese wie, von GREGORY & LEETE [12] angedeutet, über das 20-

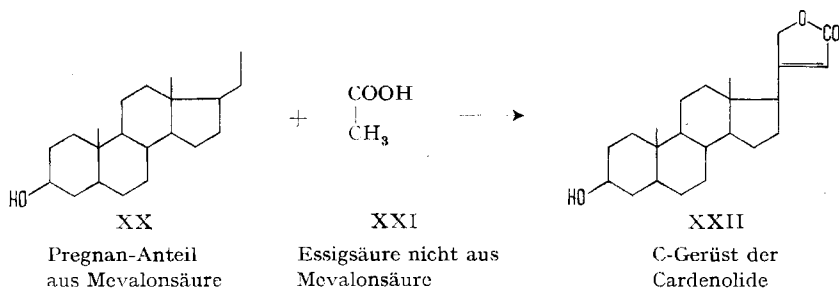
¹³⁾ Die Bestimmung der Radioaktivität wurde von Herrn Dr. F. KALBERER im Isotopenlabor der Firma SANDOZ AG, Basel, ausgeführt, wofür auch hier bestens gedankt sei. Die organischen Stoffe wurden im Sauerstoffkolben verbrannt, das CO₂ in einer methanolischen Äthanolamin-Lösung absorbiert und nach Zusatz von Toluol-Scintillator-Lösung im Flüssigkeits-Scintillationszähler gemessen, vgl. [27].

¹⁴⁾ Berechnet aus den Werten von Präparat 1235.

¹⁵⁾ Berechnet für den Fall, dass die ganze Radioaktivität von XIX in den 5 fettgedruckten C-Atomen konzentriert wäre, also in C-20 daher 1/5 der total vorhandenen Menge.

¹⁶⁾ Es kann teilweise auch daran liegen, dass wir relativ hochaktives Digitoxigenin unverdünnt abgebaut haben, so dass kleine Aktivitäten noch messbar waren.

Oxoderivat V erfolgt. Dieses würde also auf ähnlichem Wege¹⁷⁾ entstehen wie Progesteron, das ausschliesslich (oder zumindest vorzugsweise) via Cholesterol gebildet wird [6]. Unsicher bleibt, in welchem Zeitpunkt die 14 β -ständige Hydroxylgruppe sowie der Zuckerrest im Digitoxin eingeführt werden. Auf Grund des gleichzeitigen



Vorkommens von Cardenoliden und Pregnanderivaten lassen sich aber einige Vermutungen aufstellen. Aus verschiedenen Cardenolid führenden Pflanzen (z. B. aus *Digitalis*-Arten¹⁸⁾ sowie besonders aus vielen Asclepiadaceen) wurden zahlreiche Glykoside von Pregnanderivaten isoliert (vgl. Formeln XXIII–XXXV¹⁹⁾). Alle sind ursprünglich mit Zuckern verknüpft, wie sie auch in Cardenoliden vorkommen [43]. Von diesen Pregnanderivaten kommen XXIII–XXVII sowie XXIX als direkte Vorstufen für die Biosynthese von Cardenoliden kaum in Frage, es dürfte sich eher um Endprodukte einer Seitenlinie handeln. Rein formal könnten jedoch Stoffe vom Typus XXVIII²⁵⁾ sowie XXXII–XXXIII oder XXXIV und XXXV [42] bzw. ihre Glykoside sehr wohl Vorstufen zur Biosynthese der Cardenolide darstellen, ein Beweis steht vorläufig aus. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass kürzlich das Keton XXXV in einer Asclepiadacee aufgefunden wurde²¹⁾²⁵⁾, die auch Uzaringenin enthält. Ob die 17 α -Pregnanderivate XXVIII und XXXIII als solche in der

¹⁷⁾ Bisher ist nur bewiesen, dass der Pregnananteil des Digitoxigenins aus Mevalonsäure entsteht. Es fehlt noch der Beweis, dass der Weg weiter über Squalen und Lanosterol (oder ein ähnliches Sterol) verläuft. Die Endresultate wären dieselben, wenn an Stelle von Squalen und Lanosterol Zwischenprodukte mit einer Isopentenyl-Einheit weniger durchlaufen würden. Die Vorstufe von XX wäre dann ein 17-Isopropylandrostan. Solche Stoffe sind aber in der Natur bisher noch nie beobachtet worden.

¹⁸⁾ Von TSCHESCHE & BUSCHAUER [28], als Digitanol-Glykoside bezeichnet.

¹⁹⁾ Eine Zusammenstellung gibt TSCHESCHE [15], doch sind viele der darin gegebenen Formeln überholt, daher werden die wichtigsten neuen Resultate zusammengestellt. Eine gute neue Zusammenstellung der aus *Digitalis purpurea* und *D. lanata* bisher isolierten Digitanol-Glykoside geben SHOPPEE *et al.* [29].

²⁰⁾ Teilsynthese vgl. [34].

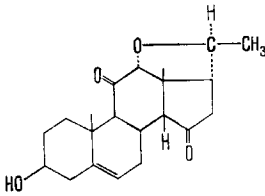
²¹⁾ Isolierung aus *Trachycalychna fimbriatum* neben Uzaringenin, vgl. [35].

²²⁾ Zuerst von TSCHESCHE & GRIMMER [39] isoliert und dort als Anhydro-digipurugenin bezeichnet. Von TSCHESCHE, BRÜGMANN, MARQUARDT & MACHLEIDT [40] als Digipurpurugenin-II bezeichnet.

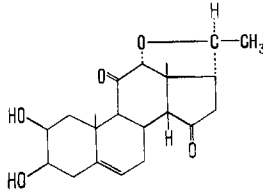
²³⁾ Formel und Identifizierung nach MITSUHASHI & NOMURA [33a]; vgl. [41].

²⁴⁾ Soll nach MITSUHASHI & NOMURA [33a] mit Iso-digipurpurugenin-II identisch sein, das von TSCHESCHE, BRÜGMANN *et al.* [40] erwähnt, aber nicht beschrieben wurde.

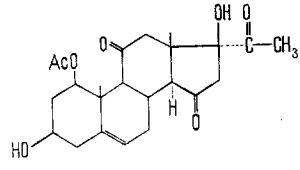
²⁵⁾ Die 17 α -Pregnan-20-one stellen bei 14 β -Steroiden die stabilere Form dar [44], das gilt auch für 14 β -Hydroxy-Derivate [45]; die Reaktion ist auch hier reversibel, wobei im Gleichgewicht das Verhältnis von XXXII: XXXIII = ca. 1:4 erreicht wird [33a].



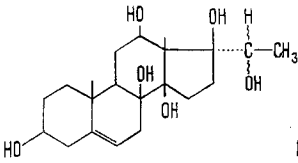
XXIII Diginigenin [29]



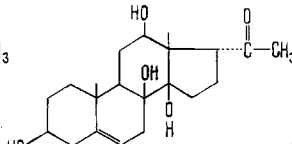
XXIV Digifologenin [29] [30]



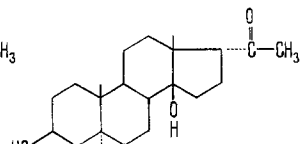
XXV Digacetigenin [31]



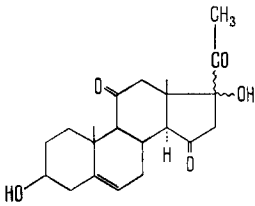
XXVI Sarcostin
provisorische Formel
[32] [33]



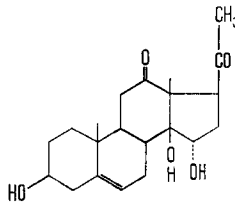
XXVII Lineolon = Desacyl-
cynanchogenin,
provisorische Formel
[32] [33]



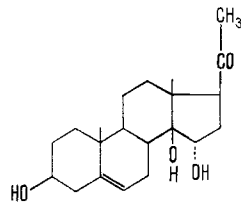
XXVIII
3β, 14β-Dihydroxy-5α,
17α-pregnan-20-on²⁰⁾ ²¹⁾



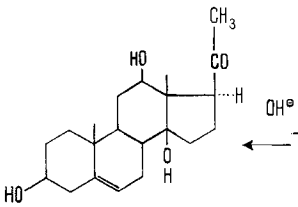
XXIX γ-Digiprogenin [36]



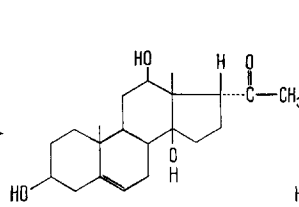
XXX Purprogenin [37]



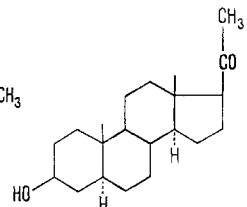
XXXI Purpnigenin [38]



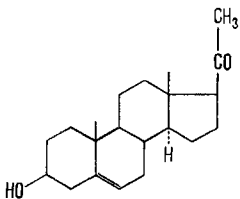
XXXII Digipurprogenin-II²²⁾ =
Isoramanon²³⁾



XXXIII Ramanon²³⁾ ²⁴⁾



XXXIV 3β-Hydroxy-5α-
pregnan-20-on [42]

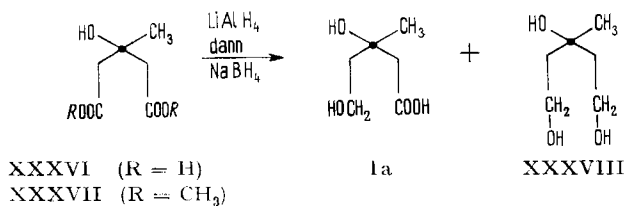


XXXV 3β-Hydroxy-Δ⁵-pregnan-20-on [42]

Hier sind nur die Formeln von Pregnanderivaten gegeben (nicht alle streng bewiesen), die aus Pflanzen isoliert wurden, welche gleichzeitig auch Cardenolide produzieren.

Pflanze vorkommen oder erst bei der Isolierung aus den 17β -Derivaten entstehen²⁵⁾, ist nicht völlig sicher. Bei XXIII, XXIV und XXVI ist die 17α -Konfiguration stabil und gut gesichert.

Bereitung der DL-Mevalonsäure-[3- ^{14}C] Ia. – Für die Bereitung der radioaktiven Mevalonsäure (Ia) haben wir die partielle Reduktion [46] von käuflicher²⁶⁾



β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure-[3- ^{14}C] (XXXVI) in der von TSCHESCHE & MACHLEIDT [47] beschriebenen Ausführungsform benützt. Die Menge von LiAlH_4 ist kritisch und die Reaktion wurde durch Vorversuche mit inaktivem Material geübt. Das entstandene Gemisch der 3 Stoffe XXXVI, Ia und XXXVIII konnte durch präparative Papierchromatographie im System A von TSCHESCHE & MACHLEIDT [47] gut getrennt werden. Aus 34,2 mg XXXVI (mit 0,50 mC) wurden 19 mg NH_4 -Salz von Ia (papierchromatographisch rein) erhalten (mit total 0,256 mC).

Nachtrag bei der Korrektur: Herr Prof. TSCHESCHE sandte uns kürzlich ein Manuskript (R. TSCHESCHE & G. LILIENWEISS, Zeitschr. f. Naturforsch. Teil B, im Druck). Darin wird gezeigt, dass β -D-Glucopyranosid von Pregnenolon-21- ^{14}C in Pflanzen von *Digitalis lanata* in radioaktives Digitoxigenin übergeführt wird. Papierchromatographisch liessen sich daneben Xysmalogenin, Digoxigenin und Gitoxigenin in radioaktiver Form nachweisen. Dies steht in guter Übereinstimmung mit obigen Befunden und zeigt ausserdem, dass die 14-ständige HO-Gruppe in das fertige Pregnangerüst eingebaut wird. Unsicher bleibt, ob dies vor oder nach der Bildung des Butenolidringes erfolgt. Wir danken Herrn Prof. TSCHESCHE auch hier, dass er uns das Manuskript vor der Publikation zur Einsicht sandte.

Wir danken der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, auch hier für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit, und den Herren Prof. D. ARIGONI und CH. TAMM sowie Herrn Dr. EK. WEISS für Literaturhinweise, und ebenso Herrn H. SAUER für seine Hilfe bei der Korrektur des Manuskriptes.

Experimenteller Teil

Bereitung der DL-Mevalonsäure-[3- ^{14}C] (Ia). 34,2 mg β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure-[3- ^{14}C] (XXXVI) wurden in 1 Tropfen Methanol verflüssigt, bei 0° mit ätherischer Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt und 5 Minuten stehengelassen. Nach Eindampfen wurde der Dimethylester XXXVII bei 0,06 Torr und 70 – 75° Badtemperatur destilliert (Ausbeute 36 mg).

Der Dimethylester XXXVII (36 mg) wurde in 1 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren in N_2 -Atmosphäre unter H_2O -Ausschluss bei 0° die frisch bereitete, durch Glasfritte unter N_2 filtrierte, klare Lösung von 4,6 mg (= 1,25 Mol.) LiAlH_4 ²⁷⁾ in 1,7 ml Tetrahydrofuran innerhalb 10 Min. zugetropt. Dann wurde noch 10 Min. bei 20° gerührt. Hierauf wurden 6 mg NaBH_4 in 1 ml Wasser zugegeben und erneut 4 Std. bei 20° gerührt. Hierauf wurden 2 ml 0,2N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -

²⁶⁾ Bezogen von der NEW ENGLAND NUCLEAR CORP., 575 Albany Street, Boston 18, Mass. USA.

²⁷⁾ Für die Gehaltsbestimmung wurden jeweils 5 ml der Lösung mit 1 ml Methanol und 5 ml Wasser versetzt und mit 0,1N HCl gegen Phenolphthalein titriert.

Lösung zugegeben und die Mischung 16 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurden heiss 40 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugegeben, das Tetrahydrofuran im Vakuum entfernt und heiss mit 2N H_2SO_4 bis zur eben kongosaueren Reaktion versetzt. Das BaSO_4 wurde durch eine Mikronutsche abfiltriert und mit kleinen Portionen Wasser und Methanol gewaschen. Das im Vakuum von Methanol befreite, leicht trübe Filtrat wurde in einem KUTSCHER-STEUDEL-Apparat²⁸⁾ mit Na_2SO_4 halb gesättigt und dann 6 Std. kontinuierlich mit Äther extrahiert, wobei die Vorlage jeweils nach 2 Std. gewechselt wurde. Die Hauptmenge war bereits nach 2 Std. extrahiert. Die rohen Extrakte zeigten unter der Ätherschicht kleine Mengen wässriger Phase. Es wurde tropfenweise Aceton bis zur homogenen Mischung zugegeben und über Na_2SO_4 unter öfterem Umschütteln getrocknet. Die so von eventuell mitgerissener H_2SO_4 sicher befreiten Ätherlösungen gaben nach Eindampfen 32 mg rohes Gemisch von XXXVI, Ia (Lacton) und Triol XXXVIII.

Dieses wurde auf 4 mit Lösungsmittelgemisch vom System A von TSCHESCHE & MACHLEIDT [47] sowie Methanol ausgewaschenen Papierblättern (WHATMAN II) von $11,4 \times 40$ cm im System A von TSCHESCHE & MACHLEIDT [47] (*n*-Propanol-*n*-Butanol-konz. NH_3 -Wasser 6:2:1:2) getrennt. Ausführung absteigend. Laufzeit ca. 12 Std. bis die Front den unteren Rand gerade erreicht hatte. Die Trennung ist trotz hoher Beladung gut reproduzierbar. Laufstrecken von Zone 1 (XXXVI) 6–8,5 cm, Zone 2 (Mevalonsäure) ca. 14–17 cm und Zone 3 (Triol XXXVIII) ca. 23–25 cm. Um Substanzverluste durch Spritzen usw. zu vermeiden, wurden gleiche Papiere mit einem Gemisch der inaktiven Stoffe XXXVI, I und XXXVIII in demselben Troglaufen gelassen. Diese wurden zur Entwicklung mit 10-proz. Phosphormolybdänsäure in Alkohol gesprüht und anschliessend 15 Min. auf 100–110° erhitzt. Dabei färbt sich nur die unterste Zone (Triol XXXVIII) dunkelgraublau. Lässt man das trockene Papier anschliessend am Tageslicht liegen, so färbt sich der Untergrund in 1–3 Std. langsam blau, die Zonen der 3-Hydroxy-3-methyl-glutarsäure (XXXVI) und der Mevalonsäure (Ia) treten als hellgelbe Bänder hervor.

Beim aktiven Material wurde die Zone der Mevalonsäure nach der Vorlage zunächst ausgeschnitten und nur kleine Streifen der Zonen 1 und 3 zur Kontrolle entwickelt, worauf sich feststellen liess, dass Zone 2 verlustlos gewonnen worden war. Anschliessende Elution mit Methanol gab 5,0 mg NH_4 -Salz vom Ausgangsmaterial (Zone 1), 19,0 mg NH_4 -Salz der Mevalonsäure Ia (Zone 2) und 7,5 mg Triol XXXVIII (Zone 3).

Behandlung der Pflanzen. Die Pflanzen (am 10. Mai 1963 in Saatschalen gesät, am 6. Juni pikiert) wurden am 8. Juli in Töpfe gepflanzt. Vor dem Versuch (19. Aug. 1963) wurden die Basis der Rosette und der Wurzelhals gewaschen und getrocknet. Dann wurde mit einer Nähnadel ein hygrophiler Baumwollfaden [48] so durchgezogen, dass er möglichst auf der ganzen Länge im Gewebe verblieb und nur auf einem Ende ca. 2–4 cm heraushing. Dies braucht etwas Übung, da *Digitalis lanata* keinen Stamm entwickelt; unterhalb der Rosette beginnen sich gleich die Wurzeln auszubreiten. Berührt der Faden zwischendurch die Aussenluft, so wird nachher die Flüssigkeit durch Kapillarwirkung auf Blätter und Wurzeln verteilt, statt in die Zirkulation aufgenommen zu werden. – Die Umgebung der Einstichstelle in ca. 1–2 mm Abstand vom Faden wurde vorsichtig mit Siliconfett bestrichen. Dann wurde für jede Pflanze 1 mg radioaktives Ammonium-mevalonat in 1 ml Wasser in einem kleinen, unten zugespitzten Glasröhrchen so angebracht, dass der Faden bis zum untersten Ende eintauchte. Bei gelungenem Versuch war die Flüssigkeit nach ca. 2–4 Std. eingesaugt, es wurde dann mit 1 ml dest. Wasser nachgespült. Bei einigen Pflanzen war die Flüssigkeit schon nach ca. 15 Min. abgesaugt, es liess sich dann leicht feststellen, dass die Hauptmenge durch Kapillarwirkung auf die Zwischenräume zwischen den Blattstielen und Wurzeln verteilt war. Insgesamt wurden 19 Pflanzen am 19. und 20. August 1963 so behandelt, dann im Freien weiter kultiviert.

Isolierung des Digitoxigenins (VIIa). Am 9. Sept. 1963 wurden die Rosetten der 19 behandelten Pflanzen über dem Wurzelhals abgeschnitten (total 275 g) und bei 40–50° getrocknet (85 g). Dieses Material wurde gepulvert und mit 300 ml Wasser und 2 ml Toluol vermischt 20 Std. bei 20° verschlossen stehengelassen. Dann wurde mit 300 ml Alkohol versetzt, auf 70° erwärmt und abgenutscht. Der Rückstand wurde noch 8mal mit je 400 ml wässrigem Alkohol von 50 auf 90% steigendem Alkoholgehalt bei 70° extrahiert und dann verworfen. – Die vereinigten Auszüge wurden im Vakuum auf 500 ml eingeeengt, dann mit dem aus 100 g Bleidiacetat-trihydrat

²⁸⁾ Beim Einfüllen und bei der Extraktion ist darauf zu achten, dass keine Tröpfchen von wässriger H_2SO_4 überkriechen können.

kalt bereiteten, gründlich mit Wasser gewaschenen und in 500 ml Alkohol suspendierten $\text{Pb}(\text{OH})_2$ versetzt und 10 Min. energisch geschüttelt. Hierauf wurde durch ein mit wenig Kieselgur (Hyflo Super Cel) gedichtetes Filter genutscht, das klare Filtrat mit verd. H_2SO_4 auf $\text{pH} = 6$ gebracht und unter Kontrolle des pH im Vakuum auf 300 ml eingengt. Es wurde mit 900 ml Alkohol versetzt, ausgefallenes PbSO_4 abfiltriert und das Filtrat 3mal mit je 300 ml Petroläther ausgeschüttelt. Die 2mal mit je 50 ml 75-proz. Alkohol gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Petrolätherauszüge gaben nach Eindampfen 860 mg dunklen Rückstand.

Die wässrig-alkoholischen Lösungen wurden im Vakuum auf 100 ml eingengt und 5mal mit je 300 ml Chloroform, dann 3mal mit je 150 ml Chloroform-Alkohol-(2:1) [49] ausgeschüttelt. Diese Auszüge wurden im Gegenstrom mit 30 ml Wasser, 25 ml 2N Sodalösung und 30 ml Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Die verbliebene wässrige Phase und das erste Waschwasser wurden im Vakuum auf 50 ml eingengt, mit 5 g wasserfreiem Na_2SO_4 versetzt und 4mal mit je 150 ml Chloroform-Alkohol-(3:2) [50] ausgeschüttelt. Diese Auszüge wurden mit wenig halbgesättigter Na_2SO_4 -Lösung sowie mit 2N Sodalösung, die halb mit Na_2SO_4 gesättigt war, gewaschen. Ausbeute vgl. Tabelle 1.

Die 3,5 g Chloroformextrakt wurden in 40 ml Methanol und 40 ml 0,1N wässriger H_2SO_4 20 Min. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde das Methanol im Vakuum entfernt und der Rückstand (40 ml) noch 20 Min. auf 60° erwärmt, abgekühlt und 4mal mit je 150 ml Äthylacetat ausgeschüttelt. Die mit 20 ml Wasser, 2mal mit je 15 ml 2N Sodalösung bei 0° und noch 2mal mit je 15 ml Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 1,5 g Rückstand. Es wurde an 50 g Al_2O_3 (WOELM, neutral, Akt. II) chromatographiert.

Fr. 1–4 (eluiert mit Benzol sowie Benzol-Chloroform von 20–30% Chf.-Gehalt) gaben 376 mg gelbes Eluat, löslich in Petroläther.

Fr. 5–9 (eluiert mit Benzol-Chloroform bis 50% Chloroformgehalt) gaben 101 mg dunkelgrünes Eluat, löslich in Äther.

Fr. 10–24 (341 mg, eluiert mit Benzol-Chloroform-Gemischen und reinem Chloroform) gaben aus Aceton-Äther total 112 mg krist. Digitoxigenin (VIIa), davon 105,5 mg vom Smp. $261\text{--}263^\circ$ (Präp. 1230) und 6,5 mg vom Smp. $258\text{--}263^\circ$, beide nach Dünnschichtchromatogramm einheitlich. Die eingedampften Mutterlagen (130 mg) lieferten nach Chromatographie an 7 g SiO_2 noch 3 mg krist. Digitoxigenin, total 115 mg. Aktivität vgl. Theoret. Teil.

Die Fr. 29–31 (24 mg, eluiert mit Chloroform unter Zusatz von 1–2% Methanol) enthielten nach Papierchromatogramm noch etwas Digitoxigenin und Digoxigenin, gaben aber keine Kristalle.

Die Fr. 32–36 (100 mg, eluiert mit Chloroform unter Zusatz von 2–4% Methanol) gaben aus Aceton-Äther 27 mg krist. Gitoxigenin in farblosen rhomboidalen Blättchen, Smp. $242\text{--}244^\circ$ (Präp. 1231). Nach Papierchromatogramm einheitlich; Aktivität vgl. Theoret. Teil.

Die weiteren Fr. 38–48 gaben noch 104 mg amorphes Material, das bisher nur im Papierchromatogramm untersucht wurde.

Abbau des Digitoxigenins. Die 115 mg radioaktives Digitoxigenin wurden mit 0,5 ml abs Pyridin und 0,3 ml Acetanhydrid 20 Std. bei 30° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 126 mg neutrales Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 103 mg reinste Kristalle, Smp. $231\text{--}232^\circ$ (Präp. 1232, Aktivität vgl. Theoret. Teil), sowie 19 mg Kristalle, Smp. $222\text{--}231^\circ$, und 2,5 mg amorphen Mutterlagenrückstand.

Die 124 mg Kristalle (VIII) wurden in 9 ml frisch gereinigtem Äthylacetat bei -80° 40 Min. ozonisiert (ca. 4% O_3 in O_2 mit ca. 110 ml/Min.). Dann wurde die blaue Lösung noch 20 Min. bei -80° stehengelassen, anschliessend im Vakuum bei 0° auf ca. 5 ml eingengt, mit 0,5 ml Eisessig, 0,5 ml Wasser und, unter Kühlung auf 0° und Schütteln, mit 100 mg Zinkstaub versetzt und geschüttelt bis KJ-Stärkepapier nicht mehr gebläut wurde. Nach Filtration wurde mit etwas Na-Acetatlösung versetzt, im Vakuum eingedampft, in Chloroform-Äther-(1:3) gelöst, mit Wasser und verd. Sodalösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Ausbeute 140 mg roher Glyoxylsäure-ester IX. Die Sodalösungen wurden bei 0° mit HCl angesäuert und mit Chloroform-Äther-(1:3) ausgeschüttelt. Die über Na_2SO_4 geklärten und mit ätherischer Diazo-methanolösung methylierten Auszüge gaben beim Eindampfen nur 4,6 mg «Methylester von Säure 1»²⁹⁾.

²⁹⁾ Aus diesem Material konnte hier kein reiner Stoff isoliert werden.

Die 140 mg roher *Glyoxylsäure-ester IX* wurden in 9 ml Methanol gelöst, mit 150 mg KHCO_3 , in 4,5 ml Wasser versetzt und 20 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde das Methanol im Vakuum entfernt und das kristallin ausfallende Ketol X 6mal mit je 15 ml Chloroform ausgeschüttelt. Waschen mit Wasser, Trocknen und Eindampfen gaben 98 mg rohes *Ketol X*. Die wässrigen Anteile wurden im Vakuum auf ca. 4 ml eingengt, mit verd. HCl bis zur kongosauren Reaktion versetzt und 3mal mit je 15 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die mit wenig Wasser gewaschenen, über Na_2SO_4 getrockneten und mit ätherischer Diazomethanlösung wie oben methylierten Auszüge gaben beim Eindampfen 22,5 mg «*Methylester von Säure 2*», Smp. 150–163°²⁹).

Die verbliebene wässrige Phase und das erste Waschwasser wurden mit Na_2CO_3 neutralisiert, im Vakuum auf 3 ml eingengt, mit 2N H_2SO_4 bis zur kongosauren Reaktion versetzt, mit Na_2SO_4 halb gesättigt und im KUTSCHER-STREUDEL-Apparat mit Äther extrahiert (Details wie bei Ia beschrieben). Nach 5 Std. wurden 5,2 mg Extrakt erhalten, nach weiteren 16 Std. noch 2,2 mg. Das Ganze (7,4 mg) wurde in 0,5 ml Methanol mit 25 mg *sym.*-N,N-Dibenzyl-äthylen-diamin 2 Min. leicht gekocht und dann nach Zugabe von Aceton und Äther durch Kochen das Methanol bis zur beginnenden Kristallisation verdrängt. Es kristallisierten 13 mg rohes *Derivat XII* vom Smp. 143–148°. Umkristallisieren aus Methanol-Äther gab 5,3 mg reinste Kristalle, Smp. 153–154° (Präp. 1233, Aktivität vgl. Theoret. Teil) sowie 4,1 mg weitere Kristalle vom Smp. 150–152°; nach Mischprobe identisch mit analysiertem, nicht radioaktivem Präparat 1228a (siehe unten).

Abbau des Ketols X mit NaJO_4 . 98 mg rohes *Ketol X* wurden in 6 ml frisch gereinigtem Dioxan gelöst, mit 150 mg NaJO_4 in 3 ml Wasser versetzt und 24 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde im Vakuum bei 12 Torr und 30° fast zur Trockene eingedampft, wobei Dioxan und Wasser vollständig bei –80° aufgefangen wurden (Verarbeitung siehe unten).

Der Rückstand wurde mit verd. H_2SO_4 bis zur kongosauren Reaktion versetzt und 3mal mit je 15 ml Chloroform-Äther-(1:3) ausgeschüttelt (Verarbeitung der verbliebenen sauren wässrigen Phase auf Formaldehyd siehe unten). Die Auszüge wurden einmal mit 1 ml Wasser, dann 3mal bei 0° mit je 1 ml 2N Na_2CO_3 -Lösung und 2mal mit 1 ml Wasser gewaschen. Trocknen und Eindampfen gab 43,5 mg neutrale Anteile, die noch reduzierendes *Ketol X* enthielten (siehe unten). Die Sodauszüge wurden erneut mit HCl bis zur kongosauren Reaktion versetzt, mit Chloroform-Äther ausgeschüttelt, mit Na_2SO_4 getrocknet, mit CH_3N_2 methyliert und eingedampft. Erhalten wurden 55 mg roher *Ester XIV*.

Die neutralen Anteile (43,5 mg) wurden nochmals gleich wie oben, aber bei pH=3 mit 60mg NaJO_4 nachoxydiert und gaben noch 12 mg rohen *Ester XIV*, sowie 27,9 mg Neutrales, das alkalische Silberdiamminlösung nicht mehr reduzierte. Es war ein Gemisch und bestand nach Dünnschichtchromatographie zur Hauptsache aus *3 β -Acetoxy-14-hydroxy-20-oxo-5 β -pregnan-21-säure-lacton* [51].

Die vereinigten rohen *Ester XIV* (67 mg) gaben aus Äther farblose Nadeln (35 mg), Smp. 155–157° (Präp. 1235, Aktivität vgl. Theoret. Teil). Nach Mischprobe identisch mit authentischem Material.

Isolierung des Formaldehyds. Die verbliebenen ersten sauren wässrigen Phasen wurden mit Na_2CO_3 neutralisiert und im Vakuum bei 12 Torr und 30° zur Trockne gedampft, wobei das Destillat bei –80° ausgefroren wurde. Die Destillate wurden mit den Dioxan-Wasser-Destillaten vereinigt, mit 15 mg Dimedon versetzt, 1 Std. auf 100° erhitzt und im Vakuum auf 3 ml eingengt. Beim Abkühlen kristallisierten farblose Nadeln. Umkristallisieren aus Methanol-Wasser gab 10 mg reines Dimedonderivat, Smp. 191–193° (Präp. 1234, Aktivität vgl. Theoret. Teil), sowie 2 mg weniger reine Kristalle; nach Mischprobe identisch mit authentischem Material.

Ungesättigter Ester XVII. 66 mg *Ester XIV* wurden in 0,5 ml abs. Pyridin bei 0° unter H_2O -Ausschluss mit 0,1 ml reinstem SOCl_2 versetzt und 1 Std. stehengelassen. Zerlegen mit Eis, Ausschütteln mit Chloroform-Äther, Waschen mit 2N HCl, Sodalösung und Wasser, Trocknen und Eindampfen gaben 62 mg krist. *Ester XVII*.

Hydrierung. Die 62 mg roher *Ester XVII* wurden in 2 ml Eisessig mit 24,5 mg $\text{PtO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ hydriert. Die Gasaufnahme war nach 30 Min. beendet, es wurde noch 20 Min. länger geschüttelt. Filtration, Eindampfen, Aufnehmen in Chloroform-Äther, Waschen usw. gab 62 mg krist. Rückstand, Smp. 120–128°. Authentischer reiner *Ester XVIII* schmolz bei 128–129°, die Mischprobe bei 120–128°.

Verseifung. Die 62 mg Ester XVIII wurden in 3 ml Methanol, 130 mg KOH und 0,2 ml Wasser 5 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Zusatz von 1,5 ml Wasser wurde das Methanol im Vakuum entfernt und die alkalische wässrige Lösung 2mal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt. Waschen, Trocknen und Eindampfen gab 8 mg Neutrales, daraus Kristalle vom Smp. 130–136°; nach Mischprobe identisch mit *Methylester von XIX*.

Die alkalische wässrige Phase wurde mit HCl bis zur kongosauren Reaktion versetzt und 3mal mit je 12 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die mit wenig Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 49 mg rohe *Säure XIX*. Aus Äther farblose Nadeln, Smp. 227–230°; authentisches Material und Mischprobe ebenso.

SCHMIDT-Abbau. Verwendet wurde *Chloroform*, das unmittelbar vor dem Versuch wie folgt gereinigt wurde: Mit konz. H_2SO_4 geschüttelt, bis diese farblos blieb, dann mit Wasser und 0,5N NaOH gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, mit reinem krist. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ geschüttelt und unter N_2 filtriert. – NaN_3 . Käufliches NaN_3 wurde unter N_2 in CO_2 -freiem Wasser gelöst, tropfenweise mit wässriger $\text{Ba}(\text{OH})_2$ versetzt bis keine weitere Trübung mehr entstand, erhitzt, unter N_2 filtriert, im Vakuum stark eingengt und unter Zusatz von Alkohol kristallisiert. Abgenutscht, mit 50-proz., dann mit 90-proz. CO_2 -freiem Alk. gewaschen. Die Kristalle waren frei von Ba und von CO_3 -Ionen.

In kleinen Dreihalskolben mit Rückflusskühler wurden unter reinstem N_2 0,3 ml konz. H_2SO_4 eingetragen, dann wurden 48 mg der aus radioaktivem Digitoxigenin erhaltenen 3 β -Hydroxy-5 β -ätiansäure, in 0,6 ml frisch gereinigtem Chloroform gelöst, zugegeben und mit 0,6 ml Chloroform nachgewaschen. Unter Rühren (Magnet) wurden in leichtem N_2 -Strom (Glühlampennstickstoff, 99,99-proz., 10 ml/Min.) bei 35–45° allmählich 100 mg NaN_3 durch ein Pulverzugabehrohr innerhalb 20 Min. in kleinen Portionen zugegeben, die Temperatur am Schluss auf 51° gesteigert und noch 1 $\frac{1}{4}$ Std. bei dieser Temperatur gerührt, worauf keine Zunahme der BaCO_3 -Abscheidung mehr sichtbar war. Anschliessend wurden nochmals 50 mg NaN_3 zugegeben und noch 1 $\frac{3}{4}$ Std. im N_2 -Strom gerührt, wobei aber keine merkliche Zunahme des BaCO_3 -Niederschlags mehr feststellbar war.

Das abziehende Gas passierte zuerst den Rückflusskühler, dann eine Vorlage 1 mit 1 ml 10-proz. BaCl_2 -Lösung, eine Vorlage 2 mit 6 ml kalt gesättigter wässriger $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung und Vorlage 3 mit 5 ml gleicher $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung. Nach den angegebenen 2 $\frac{1}{2}$ Std. wurde in der ersten Vorlage eine ganz leichte Trübung beobachtet, die 3. Vorlage (Kontrolle) blieb völlig klar.

Vorlage 2 wurde unter N_2 zuerst auf 100° erhitzt, dann erkalten gelassen. Hierauf wurde das BaCO_3 unter N_2 auf Glasnutsche abfiltriert, mit wenig Wasser und reinem Methanol gewaschen. Ausbeute 26,3 mg, Aktivität vgl. Theoret. Teil.

Verarbeitung des Kolbenrückstandes. Die H_2SO_4 -Lösung wurde mit Eis zersetzt und 3mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschenen und getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 21 mg Rückstand. Die sauren wässrigen Phasen wurden mit KOH (in der Kälte) stark alkalisch gemacht und 4mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Auszüge 2mal mit wenig Wasser gewaschen usw. und im Vakuum eingedampft, gaben 27,5 mg Rückstand.

SCHMIDT-Abbau von Cyclohexancarbonsäure-[7- ^{14}C]. 25 mg Cyclohexancarbonsäure-[7- ^{14}C] (Präp. 1237 mit 1100 dpm/mg) wurden genau wie oben behandelt und gaben 56,2 mg BaCO_3 (Präp. 1238 mit 464 dpm/mg). Die Abscheidung von BaCO_3 begann hier schon bei 35–40°.

Vergleichspräparat von XII aus inaktiver Glyoxylsäure. 200 mg Glyoxylsäure (frisch im Molekularkolben bei 0,01 Torr und 120–130° Badtemperatur destilliert) und 500 mg *sym.*-N,N-Dibenzyl-äthylendiamin wurden in 5 ml Methanol 3 Min. gekocht, dann wurde Äther zugegeben und bis zur Kristallisation eingengt. Umkristallisieren aus Methanol-Äther gab farblose Blättchen, Smp. 158–159° (Zers.). Bei 0,01 Torr nicht unzersetzt sublimierbar.

$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_2$ (296,36) Ber. C 72,94 H 6,80 N 9,45% Gef. C 73,16 H 6,80 N 9,29%

Vergleichspräparat aus Glykolsäure. 25 mg Glykolsäure und 70 mg *sym.*-N,N-Dibenzyl-äthylendiamin wurden in 1 ml Methanol gelöst und dieses nach Zugabe von Äther teilweise verdrängt. Farblose Blättchen, Smp. 119–120°.

$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_6\text{N}_2$ (392,44) Ber. C 61,05 H 7,19 N 7,14% Gef. C 61,00 H 7,24 N 7,21%

Die Mikroanalysen wurden von Herrn E. THOMMEN im Mikrolabor unseres Instituts ausgeführt.

SUMMARY

Mevalonic-[3-¹⁴C] acid (Ia) has been prepared by partial reduction of β -hydroxy- β -methyl-glutaric-[3-¹⁴C] acid. After introduction of the ammonium salt of Ia into *Digitalis lanata* plants by the vick technique, crist. radioactive digitoxigenin was isolated. This contained a significant amount of radioactivity in C-20 position. From this, together with results of former authors, it follows that the biosynthesis of digitoxigenin from mevalonic acid (probably via squalene) proceeds through a pregnane derivative. The latter needs only one molecule of acetate to form the butenolide ring.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. D. ROBERTS, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **46**, 2886 (1963).
- [2] M. EBERLE & D. ARIGONI, *Helv.* **43**, 1508 (1960).
- [3] R. H. CORNFORTH, J. W. CORNFORTH & G. POPJÁK, *Tetrahedron* **18**, 1351 (1962), weitere Lit. daselbst.
- [4] a) R. B. WOODWARD & K. BLOCH, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 2023 (1953); b) A. ESCHENMOSE, L. RUZICKA, O. JEGER & D. ARIGONI, *Helv.* **38**, 1890 (1955).
- [5] Vgl. z. B. DEWITT S. GOODMAN, J. AVIGAN & D. STEINBERG, *J. biol. Chemistry* **238**, 1287 (1963) und frühere Lit. daselbst, sowie J. L. GAYLOR, *ibid.* **238**, 1643, 1649 (1963).
- [6] a) G. E. W. WOLSTENHOLME & M. O'CONNOR, Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols, J. & A. Churchill Ltd. London 1959; b) G. POPJÁK & J. W. CORNFORTH, *Advances in Enzymology* **22**, 281 (1960); c) L. F. FIESER & M. FIESER, *Steroide*, übersetzt von H. GRÜNEWALD, S. 443, Verlag Chemie, Weinheim 1961; d) L. RUZICKA, *Perspektiven der Biogenese und der Chemie der Terpene*, International Symposium on the Chemistry of Natural Products, 1962, Butterworth, London 1963; *Pure appl. Chemistry* **6**, 505 (1963); e) E. C. GROB, *Die Biogenese der Carotine und Carotinoide*, 7. Symposium in Mainz 1961, *Wissensch. Veröffentl. deutsch. Ges. f. Ernährung* **9**, 26 (D. Steinkopf Verlag, Darmstadt 1963).
- [7] a) D. ARIGONI, *Experientia* **14**, 153 (1958); b) A. E. PURCELL, G. A. THOMPSON, JR. & J. BONNER, *J. biol. Chemistry* **234**, 1081 (1959); c) R. D. BENNETT, E. HEFTMANN, A. E. PURCELL & J. BONNER, *Science* **134**, 671 (1961); d) L. GUGLIEMMETTI, Diss. Zürich 1962 (zitiert bei RUZICKA [6d]); e) H. J. NICHOLAS, *J. biol. Chemistry* **237**, 1476, 1481, 1485 (1962); f) D. J. BAISTED, E. CAPSTACK & W. R. NES, *Biochemistry* **1**, 537 (1962); g) E. CAPSTACK, D. J. BAISTED, W. W. NEWSCHWANDER, G. BLONDIN, N. L. ROSIN & W. R. NES, *ibid.* **1**, 1178 (1962); h) D. J. BAISTED & W. R. NES, *J. biol. Chemistry* **238**, 1947 (1963); i) E. HEFTMANN, *Biochemistry of Plant Sterols*, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **14**, 225–246 (1963); k) S. BADER, L. GUGLIEMMETTI & D. ARIGONI, *Proc. chem. Soc. (London)* **1964**, 16.
- [8] Vgl. M. W. WHITEHOUSE, E. STAPLE & S. GURIN, *J. biol. Chemistry* **236**, 73 (1961); D. MENDELSON & E. STAPLE, *Biochemistry* **2**, 577 (1963); P. F. HALL & S. B. KORITZ, *ibid.* **3**, 129 (1964) und frühere Lit. daselbst.
- [9] M. D. SIPERSTEIN, A. W. MURRAY & E. TITUS, *Arch. Biochem. Biophysics* **67**, 154 (1957).
- [10] J. K. GRANT in *The Biosynthesis and Secretion of Adrenocortical Steroids*, p. 24, *Biochem. Soc. Symposia* Nr. 18, Cambridge University Press 1960.
- [11] E. RAMSTAD & J. L. BEAL, *Chemistry & Ind.* **1960**, 177.
- [12] H. GREGORY & E. LEETE, *Chemistry & Ind.* **1960**, 1242.
- [13] E. G. GROS & E. LEETE, *Chemistry & Ind.* **1963**, 698.
- [14] R. TSCHESCHE, *Neuere Vorstellungen auf dem Gebiet der Biosynthese der Steroide und verwandter Naturstoffe*, *Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe* **12**, 131 (1955), herausgeg. von L. ZECHMEISTER, Springer Verlag Wien, bes. S. 160–161, und frühere Lit. daselbst.
- [15] R. TSCHESCHE, *Angew. Chem.* **73**, 727 (1961).
- [16] P. R. O. BALLY, K. MOHR & T. REICHSTEIN, *Helv.* **35**, 45 (1952) und frühere Lit. daselbst.
- [17] S. RANGASWAMI & T. REICHSTEIN, *Helv.* **32**, 939 (1949).

- [18] a) K. MEYER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **30**, 1508 (1947); b) M. ZINGG & K. MEYER, *Helv.* **43**, 145 (1960); c) C. JUSLÉN, W. WEHRLI & T. REICHSTEIN, *Helv.* **45**, 2285 (1962).
- [19] T. REICHSTEIN & J. v. EUW, *Helv.* **21**, 1181 (1938).
- [20] F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **28**, 1472 (1945), dort noch mit falscher Stereochemie formuliert.
- [21] H. WOLFF, *Organic Reactions*, ed. R. ADAMS **3**, 307, New York 1946; F. MÖLLER in *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, 4. Aufl. herausgegeben von E. MÜLLER **11/1**, 872 (Stuttgart 1957).
- [22] A. LARDON & T. REICHSTEIN, *Helv.* **45**, 943 (1962).
- [23] A. LARDON & T. REICHSTEIN, *Helv.* **41**, 904 (1958).
- [24] G. DARZENS, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. **152**, 1601 (1911).
- [25] R. HIRSCHMANN, ST. SNODDY & N. L. WENDLER, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 3252 (1953); W. S. ALLEN & S. BERNSTEIN, *ibid.* **77**, 1028 (1955); H. P. SIGG, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 1721 (1955); O. SCHINDLER, *ibid.* **39**, 375 (1956).
- [26] T. REICHSTEIN & H. G. FUCHS, *Helv.* **23**, 658 (1940).
- [27] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Helv.* **44**, 1956 (1961).
- [28] R. TSCHESCHE & G. BUSCHAUER, *Liebigs Ann. Chem.* **603**, 59 (1957).
- [29] a) C. W. SHOPPEE, R. E. LACK & A. V. ROBERTSON, *Proc. chem. Soc. (London)* **1962**, 65; b) *idem*, *J. chem. Soc.* **1962**, 3610; vgl. auch R. TSCHESCHE & G. BRÜGMANN, *Tetrahedron* (im Druck; briefliche Mitteilung von Herrn Prof. R. TSCHESCHE).
- [30] C. W. SHOPPEE, R. E. LACK & S. STERNHELL, *J. chem. Soc.* **1963**, 3281.
- [31] C. W. SHOPPEE & R. E. LACK, *J. chem. Soc.* **1964**, im Druck (Privatmitteilung).
- [32] K. A. JAEGGI, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **46**, 694 (1963).
- [33] a) H. MITSUHASHI & T. NOMURA, *Chem. pharmac. Bull. (Japan)* **11**, 1333 (1963); b) H. MITSUHASHI & Y. SHIMIZU, *Steroids* **2**, 373 (1963).
- [34] PL. A. PLATTNER, L. RUZICKA, H. HEUSSER & E. ANGLIKER, *Helv.* **30**, 385 (1947).
- [35] Diss. R. ELBER, Basel 1964.
- [36] D. SATOH, *Chem. pharmac. Bull. (Japan)* **8**, 270 (1960); **10**, 43 (1962). Die Stereochemie an C-17 ist nicht gesichert.
- [37] D. SATOH, H. ISHII & Y. OYAMA, *Chem. pharmac. Bull. (Japan)* **8**, 657 (1960). Die Stellung der Ketogruppe an C-12 sowie die Konfiguration an C-17 sind nicht völlig gesichert.
- [38] H. ISHII, *Chem. pharmac. Bull. (Japan)* **9**, 411 (1961); **10**, 351, 354 (1962); H. ISHII, T. TOZYO & D. SATOH, *ibid.* **10**, 645 (1962); **11**, 576 (1963). Die 17 β -Konfiguration wurde inzwischen durch die Rotationsdispersion (Gef. $\alpha = +51^\circ$) gesichert (Dr. H. ISHII, briefliche Mitteilung).
- [39] R. TSCHESCHE & G. GRIMMER, *Chem. Ber.* **88**, 1569 (1955).
- [40] R. TSCHESCHE, G. BRÜGMANN, H. W. MARQUARDT & H. MACHLEIDT, *Liebigs Ann. Chem.* **648**, 185 (1961).
- [41] R. TSCHESCHE, G. BRÜGMANN & G. SNATZKE, *Tetrahedron letters*, im Druck (briefliche Mitteilung von Herrn Prof. R. TSCHESCHE).
- [42] R. TSCHESCHE & G. SNATZKE, *Liebigs Ann. Chem.* **636**, 105 (1960).
- [43] T. REICHSTEIN, *Angew. Chem.* **74**, 887 (1962), sowie T. REICHSTEIN & EK. WEISS, *Advances Carbohydrate Chem.* **17**, 65 (1962).
- [44] A. BUTENANDT & L. MAMOLI, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **68**, 1847 (1935); A. BUTENANDT & G. FLEISCHER, *ibid.* **70**, 96 (1937); A. BUTENANDT, J. SCHMIDT-THOMÉ & H. PAUL, *ibid.* **72**, 1112 (1939). Entspr. 21-Hydroxyketon vgl. C. W. SHOPPEE & T. REICHSTEIN, *Helv.* **23**, 925 (1940).
- [45] A. LARDON, *Helv.* **32**, 1517 (1949).
- [46] D. E. WOLF, C. H. HOFFMAN, P. E. ALDRICH, H. R. SKEGGS, L. D. WRIGHT & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 1486 (1957).
- [47] R. TSCHESCHE & H. MACHLEIDT, *Liebigs Ann. Chem.* **631**, 61 (1960).
- [48] C. L. COMAR: *Radioisotopes in Biology and Agriculture*, p. 151, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, Toronto, London 1955.
- [49] A. STOLL, J. RENZ & W. KREIS, *Helv.* **20**, 1484 (1937).
- [50] A. STOLL & J. RENZ, *Helv.* **22**, 1193 (1939), bes. S. 1202; W. NAGATA, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **40**, 41 (1957).
- [51] F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **28**, 1472 (1945); K. MEYER, *Helv.* **30**, 1976 (1947).