

2. I ergab mit *o*-Phenylendiamin bei Siedetemperatur VIII in 94% Ausbeute.

3. Die Umsetzung von I mit 1,8-Diaminonaphthalin in kochendem Nitrobenzol ergab eine Substanz, die wahrscheinlich das Naphtimidazol V darstellt.

Technisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] XI. Teil; B. K. MANUKIAN, Helv. 46, 2747 (1963).
- [2] H. HOPFF & B. K. MANUKIAN, Helv. 45, 1287, 1799 (1962); 44, 1922 (1961).
- [3] H. DE DIESBACH & H. RIAT, Helv. 24, 1306 (1941).
- [4] J. ARIENT & L. HAVLIČKOVÁ, Coll. czech. chem. Commun. 28, 2534 (1963).
- [5] E. LUTZ, Dipl.-Arbeit ETH Zürich und Universität Mainz, Nov. 1952 bis Febr. 1954.
- [6] W. RÜTTIMANN, Diss. ETH Zürich, Nr. 2471, 1956.
- [7] J. DASSIGNY, FP. 1075110 (13. Okt. 1954); Chem. Abstr. 53, 8643 (1959).

248. Umwandlung von Krötengiften (Bufadienoliden) durch Mikroorganismen.

II. 12 β -Hydroxyresibufogenin¹⁾

12. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]²⁾

von M. Schüpbach und Ch. Tamm

(14. X. 64)

Die Umwandlung von digitaloiden Lactonen (Cardenoliden) durch Mikroorganismen ist in den letzten Jahren eingehend studiert worden [3]. Das Verhalten der Steroid-Krötengifte (Bufadienolide) gegenüber den mikrobiellen Enzymen wurde jedoch kaum untersucht. TAMM & GUBLER [4] stellten lediglich fest, dass Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) Bufalin und 3-Dehydrobufalin in der 12 β -Stellung zu hydroxylieren vermögen. Die beiden Bufadienolide verhielten sich gegenüber diesem Organismus somit gleich wie die analogen Substrate der Cardenolidreihe. Die Natur des an C-17 haftenden Lactonrings beeinflusste die Reaktionen nicht. Auf Grund dieser und weiterer Befunde [5] schlossen wir, dass für den Angriffsort der Hydroxylase von *F. lini* die Stereochemie des Steroidskeletts, insbesondere die *cis*-Verknüpfung der Ringe C und D ausschlaggebend ist. Alle bisher untersuchten Verbindungen der C/D-*cis*-Reihe enthielten aber noch eine Hydroxylgruppe in 14-Stellung. Um ihren Einfluss abzuklären, war es wünschenswert, das Verhalten von Substraten kennenzulernen, die an Stelle des 14 β -Hydroxyls ein H-Atom oder eine 14 β , 15 β -Epoxygruppe besitzen. Entsprechende 14-Desoxycardenolide und -Bufadienolide sind, abgesehen von 14 β -Artebufogenin [5a], das aber noch eine 15-Ketogruppe enthält, nicht bekannt; hingegen enthalten Resibufogenin (1) und 14 β , 15 β -Epoxy-14-anhydro-digi-

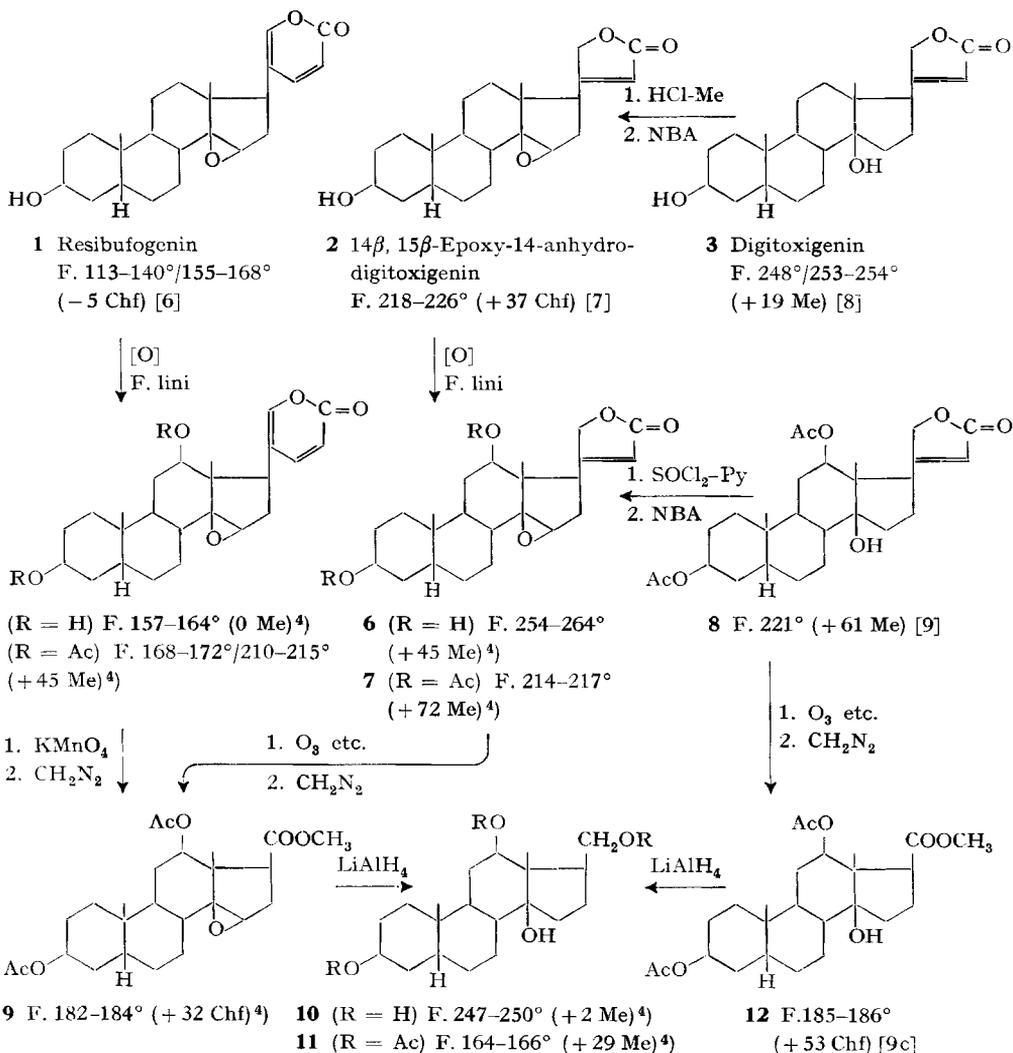
¹⁾ Über diese Untersuchungen wurde am «International Symposium on the Chemistry of Natural Products», Kyoto, Japan, 12. – 18. April 1964, berichtet [2].

²⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2225.

toxigenin (2) einen Oxiranring in der gewünschten Stellung. Im folgenden berichten wir über die Resultate, die bei der Inkubation dieser beiden Verbindungen mit wachsenden Kulturen von *F. lini* erzielt wurden³⁾.

Die mikrobiologischen Umsetzungen wurden, wie früher beschrieben [4] [5], in Schüttelkulturen unter aeroben Bedingungen bei 25–27° durchgeführt. Der Reaktions-

Formelschema



Ac = CH₃CO–; NBA = N–Bromacetamid; Chf = Chloroform; Me = Methanol; Py = Pyridin.

Die Zahlen in runden Klammern geben die spez. Drehungen für Na-Licht an.

³⁾ Wir möchten auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. KUNO MEYER, Basel, für die grosszügige Überlassung einer grösseren Menge Resibufogenin herzlich danken.

⁴⁾ Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

verlauf wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatogrammen verfolgt, die Produkte durch Chromatographie an Silicagel oder Kieselgel gereinigt und in üblicher Weise charakterisiert bzw. indentifiziert.

Resibufogenin (**1**) ergab nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen in ca. 60-proz. Ausbeute ein krist. Reaktionsprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm einheitlich war und langsamer als **1** lief⁵⁾. Nach dem UV.-Spektrum ($\lambda_{max} = 298 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 3,76$) war der Lactonring intakt geblieben. Die Analysenwerte deuteten auf die Formel $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ eines Monohydroxyderivats von **1** hin. Auf Grund der Abbaureaktionen (s. unten) kommt ihm die Struktur des noch unbekanntes 12 β -Hydroxyresibufogenins (**4**) zu⁶⁾. Bei der Behandlung mit Acetanhydrid in Pyridin bei 37° wurde das Di-O-acetylderivat **5** ($\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_7$) erhalten, das im IR. keine HO-Schwingungen mehr aufwies (vgl. Fig. 1). Um die Stellung der neu eingetretenen HO-Gruppe abzuklären, wurde das Di-O-acetylderivat **5** mit KMnO_4 in Aceton abgebaut. Die sauren Anteile der Oxydationsprodukte lieferten nach Behandlung mit Diazomethan in Äther den krist. 3 β , 12 β -Diacetoxy-14, 15 β -epoxy-5 β , 14 β , 17 α H-ätiansäure-methylester (**9**). Das IR.-Spektrum (in KBr) (vgl. Fig. 3) von **9** zeigt keine HO-Bande, wies jedoch bei 3,31 μ die typische CH-Schwingung des am Oxiranring haftenden 15 α H-Atoms auf [10]. Die Behandlung des Esters **9** mit LiAlH_4 führte unter Öffnung des Oxidrings und reduktiver Spaltung aller Esterbindungen zum Tetrol **10**. Mit Acetanhydrid und Pyridin lieferte es ein Tri-O-acetylderivat **11**, dessen IR.-Spektrum an Stelle der C-H-Schwingung des Epoxids eine freie HO-Bande bei 2,46 μ zeigte. Das gleiche Tetrol **10** wurde durch LiAlH_4 -Reduktion des bekannten 3 β , 12 β -Diacetoxy-14-hydroxy-5 β , 14 β , 17 α H-ätiansäure-methylesters **12** erhalten, der durch O_3 -Abbau von Di-O-acetyl-digoxigenin (**8**) leicht zugänglich ist. Auch das aus diesem Tetrol bereitete Tri-O-acetylderivat **11** war identisch mit dem durch den Abbau von 12 β -Hydroxyresibufogenin (**4**) erhaltenen Präparat.

Die Umsetzung von 14 β , 15 β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (**2**)⁷⁾ mit *Fusarium lini* ergab nach Inkubation während 9 Tagen, in 50–60-proz. Ausbeute, wieder ein einziges krist. Reaktionsprodukt⁵⁾, dessen Analysenwerte auf die Formel $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$ eines Monohydroxyderivats von **2** passten. Auch hier war nach dem UV.-Spektrum ($\lambda_{max} = 214 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 4,17$) der Lactonring unversehrt geblieben. Es liegt das noch unbekannte 14 β , 15 β -Epoxy-14-anhydro-digoxigenin (**6**) vor. Der Strukturbeweis wurde wie folgt erbracht: Mit Acetanhydrid-Pyridin lieferte **6** das Di-O-acetylderivat, dessen IR.-Spektrum wieder die für den 14 β , 15 β -Oxiranring typische C-H-Schwingung des 15 α -H-Atoms bei 3,31 μ , jedoch keine Hydroxylbande aufwies. Wurde nun Di-O-acetyldigoxigenin (**8**) mit SOCl_2 -Pyridin bei -15° und das gebildete 14-Anhydroderivat mit N-Bromacetamid in Aceton-Wasser analog zu den Angaben von HOFER *et al.* [7] behandelt, so resultierte Di-O-acetyl-14 β , 15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin (**7**),

⁵⁾ Das Dünnschichtchromatogramm des Rohextrakts liess mindestens vier weitere, allerdings sehr schwache Flecke erkennen. Es wurde nicht versucht, diese Spuren von Nebenprodukten zu isolieren.

⁶⁾ Da 12 β -Hydroxyresibufogenin (**4**) stark hygroskopisch ist, lieferten die C,H-Bestimmungen keine befriedigenden Analysenwerte. Die Analysenresultate des Di-O-acetylderivats **5** und aller weiteren Reaktionsprodukte stimmten jedoch mit den postulierten Formeln sehr gut überein.

⁷⁾ **11** ist nach HOFER *et al.* [7] aus Digitoxigenin (**3**) durch Wasserabspaltung mit HCl-Methanol und anschliessende Epoxydation mit N-Bromacetamid leicht erhältlich.

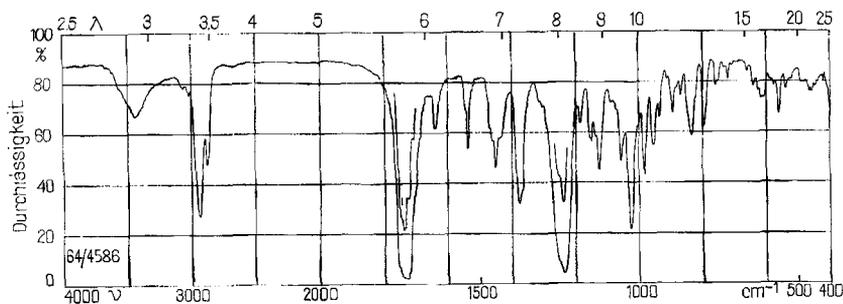


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Di-O-acetyl-12 β -hydroxy-resibufogenin (5) fest in KBr⁸⁾

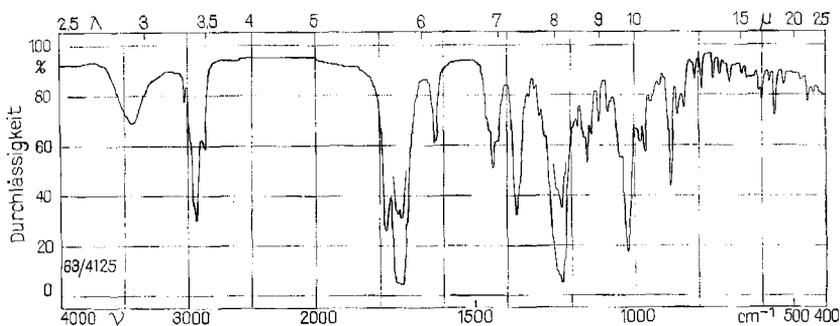


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von Di-O-acetyl-14 β ,15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin (7) in CH₂Cl₂-Lösung⁸⁾

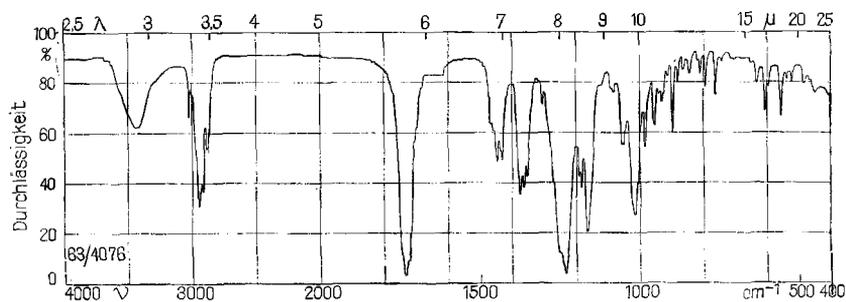


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum von 3 β ,12 β -Diacetoxy-14 β ,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-ätiansäure-methylester (9) fest in KBr⁸⁾

das mit dem obigen durch Hydroxylierung und Acetylierung von **2** erhaltenen Präparat identisch war. Zur Sicherheit wurde **7** mit Ozon abgebaut⁹⁾. Der aus den sauren Anteilen mit Diazomethan resultierende Methylester war identisch mit dem durch den oxydativen Abbau erhaltenen 3 β ,12 β -Diacetoxy-14 β ,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-ätiansäure-methylester (**9**). Damit ist 12 β -Hydroxy-resibufogenin (**4**) nochmals mit Digoxigenin verknüpft worden.

⁸⁾ Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, im Spektrollabor des Instituts (CH. SENN und W. SCHWAB).

Aus diesen Versuchen geht klar hervor, dass sich die 14 β ,15 β -Epoxyde bei der Hydroxylierung durch *F. lini* gleich wie die Substrate mit einer 14 β -Hydroxygruppe verhalten. Für die bei beiden Strukturtypen beobachtete 12 β -Hydroxylierung ist, wie angenommen, ausschliesslich die cis-Verknüpfung der Ringe C und D massgebend.

Herr Dr. K. K. CHEN, Indianapolis, war so freundlich, die Toxizität von 12 β -Hydroxy-resibufogenin (4), 14 β ,15 β -Epoxy-14-anhydro-digoxigenin (6) und von 14 β ,15 β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin an der Katze nach HATCHER-BRODY zu prüfen¹⁰⁾. Seine Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt, wo zum Vergleich noch der Wert von Resibufogenin (1) aufgeführt ist. Aus den Zahlen der Tabelle geht hervor, dass 12 β -Hydroxyresibufogenin (4) deutlich, wenn auch schwach, wirksam ist, während alle anderen 14 β ,15 β -Oxide, sowohl der Cardenolid- wie auch der Bufadienolidreihe, inaktiv sind.

Toxizität an der Katze

Substanz	Geometrisches Mittel der letalen Dosis (Katze) in mg/kg (= 1 Katzeinheit)
12 β -Hydroxyresibufogenin (4)	3,378–4,583 ¹¹⁾
Resibufogenin (1)	inaktiv [6a]
14 β ,15 β -Epoxy-14-anhydro-digoxigenin (6)	> 11,273
14 β ,15 β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2)	> 5,88

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN (Projekt Nr. 2535) danken wir für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeit.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze etwa $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Messung der Spektren und der spez. Drehungen wurden ca. 1 Std. bei 0,02 Torr/60–70° und zur Elementaranalyse 5 Std. bei 0,01 Torr/110° mit Einwaage im Schweinchen getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts (Leitung E. THOMMEN). Die Adsorptionschromatographien wurden nach der Durchlaufmethode [11] an Silicagel (SiO₂, Korngrösse 0,15–0,30 mm) und nach DUNCAN [12] an Kieselgel (SiO₂, Korngrösse 0,05–0,2 mm) durchgeführt. Dünnschichtchromatographie (= DC) mit Kieselgel als Adsorbens nach STAHL [13]. Entwickeln der Flecke durch Besprühen mit 20-proz. SbCl₃-Lösung in Chloroform [14]. Abkürzungen: Me = Methanol, Md = Methylenchlorid.

2. *Kultur der Mikroorganismen.* – *Kulturen.* Proben einer Schrägagarkultur von *Fusarium lini* (BOLLEY) (Herkunft: CENTRALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Baarn, Niederlande (CBS)) wurden direkt als Impfmateriale für die Nährlösung verwendet oder zur Sporulierung auf Reismedium (13 g polierter Reis und 25 ml Wasser im ERLNMEYER-Kolben von 500 ml sterilisiert) überimpft. Im letzteren Falle wurde eine wässrige Suspension der drei Wochen alten, bei 27° inkubierten Kulturen als Impfmateriale verwendet. Zum Versuch wurden 100 ml-ERLNMAYER-Kolben mit je 20 ml Nährlösung benutzt. Die Gefässe wurden 30 Min. bei 120° im Dampfautoklav sterilisiert und dann beimpft. Die ERLNMEYER-Kolben wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) bei 27° 3–10 Tage inkubiert, worauf das in Aceton gelöste Substrat nach Sterilfiltration zugegeben wurde.

⁹⁾ Auffallenderweise musste die Essigesterlösung von 7 viel länger und bei höherer Temperatur als üblich mit Ozon behandelt werden.

¹⁰⁾ Wir möchten Herrn Dr. K. K. CHEN, Indianapolis, Ind. USA, für diese Bestimmungen bestens danken.

¹¹⁾ Werte bestimmt an 2 Katzen, die kontinuierlichen Tremor zeigten. Mäuse zeigten nach der intravenösen Injektion Hyperaktivität, Tremor und Konvulsionen.

Nährlösung nach CZAPEK: 30 g Saccharose; 3,0 g NaNO₃; 1 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O; 0,5 g KCl und 10 mg FeSO₄ · 7H₂O mit dest. Wasser ad 1000 ml; pH auf 7,3 eingestellt.

3. *Umsetzung von Resibufogenin (1) mit Fusarium lini*. Eine Lösung von 500 mg Resibufogenin (1) vom Smp. 90°/160–170° in 69 ml Aceton wurde, gleichmässig verteilt, steril zu 69 100-ml-ERLENMEYER-Kolben gegeben und 10 Tage bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt. Hierauf wurde der Inhalt jedes Kolbens mit 5 ml Methanol versetzt, 2 Std. stehengelassen und abgenutscht. Der Rückstand wurde noch zweimal analog mit Methanol behandelt. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum vom Methanol befreit und auf ca. 800 ml eingengt. Die resultierende trübe wässrige Lösung wurde viermal mit Chloroform-Äthanol-(85:15) ausgeschüttelt. Die Auszüge ergaben nach Waschen mit wenig Wasser, Trocknen mit Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum 630 mg Rohprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Md-Me-(93:7)) einen starken gelbvioletten Fleck von 12β-Hydroxyresibufogenin (4) (Rf-Wert: 0,12) und 4 sehr schwache Flecke (Rf-Werte: 0,03/0,25/0,45/0,51) (vgl. Rf-Wert von Resibufogenin (1): 0,45; grünblau) zeigte. Das Rohprodukt wurde an 35 g Silicagel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 70 ml Lösungsmittel pro Fraktion.

Die Fraktionen 1–6 (eluiert mit Md) ergaben 103 mg gelbes Öl, verworfen.

Die Fraktionen 9–14 (eluiert mit Md-Me-(98:2)) ergaben ca. 115 mg Rohprodukt, das im DC mehrere Flecke zeigte, aber nur zum kleinsten Teil noch Edukt I enthielt.

Die Fraktionen 15–18 (eluiert mit Md-Me-(95:5)) ergaben 340 mg Rohprodukt (im DC einheitlich), das aus Aceton-Äther 300 mg Kristalle lieferte. Nach Umkristallisieren reines 12β-Hydroxyresibufogenin (3β,12β-Dihydroxy-14,15β-epoxy-5β-Δ²⁰,22-bufadienolid) (4) in groben Prismen vom Smp. 157–163° (Sintern ab 107°). Smp. der erstarrten Schmelze 158–163° (ohne Sintern). $[\alpha]_D^{22} = 0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,090$ in Methanol). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{max} = 298 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 3,76$.

C₂₄H₃₂O₅ (400,5) Ber. C 71,97 H 8,05% Gef. C 73,09; 70,92 H 8,62; 8,19%

4. *Di-O-acetyl-12β-hydroxy-resibufogenin (5) aus 4*. 108 mg 4 vom Smp. 153–163° (Sintern ab 107°) wurden mit 2 ml abs. Pyridin und 1,8 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 37° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand mehrmals mit Benzol im Vakuum abgedampft. Es resultierten 130 mg Rohprodukt, das durch Chromatographie an 8 g Silicagel mit Me-Md-(98:2) als Lösungsmittel gereinigt wurde. Aus Aceton-Äther resultierten 111 mg Körner vom Doppelsmp. 168–172°/210–215°. $[\alpha]_D^{22} = +46^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,791$ in Methanol). Im IR.-Spektrum (in CH₂Cl₂) Banden bei 5,70–5,85 μ (C=O, Cumalinring + Acetyl und 8,10 μ (-O-CO-CH₃)). IR.-Spektrum (fest in KBr) Banden bei 3,31 μ (CH, Epoxid); 5,78 μ (breit, C=O, Cumalinring + Acetyl), 6,11 μ (C=C, Cumalinring) und 8,05 μ (-OCOCH₃).

C₂₈H₃₆O₇ (484,6) Ber. C 69,40 H 7,48% Gef. C 69,23 H 7,60%

5. *Umsetzung von 14β,15β-Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2) mit Fusarium lini*. Eine Lösung von 500 mg 14β,15β-Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2) vom Smp. 210–220° in 80 ml Aceton wurde, gleichmässig verteilt, steril zu 80 100-ml-ERLENMEYER-Kolben gegeben und 9 Tage bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt. Hierauf wurden die vereinigten Kulturlösungen mit 500 ml Methanol 1 Std. geschüttelt, vom Mycel abgenutscht und dieses nach Zerkleinern nochmals mit 400 ml Methanol geschüttelt und abgenutscht. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum vom Methanol befreit und auf 500 ml eingengt. Die resultierende trübe wässrige Lösung wurde viermal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum resultierten 640 mg Rohprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Md-Me-(93:7)) einen starken Fleck von 14β,15β-Epoxy-14-anhydro-digoxigenin (6) (Rf-Wert 0,15) und 6 sehr schwache Flecke (Rf-Werte: 0,05/0,20/0,24/0,36/0,42/0,55) (vgl. Rf-Wert von 14β,15β-Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2): 0,42) zeigte. Das Rohprodukt wurde an 35 g Silicagel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 40 ml Lösungsmittel pro Fraktion.

Die Fraktionen 1–7 (eluiert mit Md) ergaben 23 mg Öl, verworfen.

Die Fraktionen 8–10 (123 mg, eluiert mit Md-Me-(98:2)) lieferten aus Aceton-Äther 58 mg krist. 14β,15β-Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2) vom Smp. 205–218°.

Die Fraktionen 11–13 (eluiert mit Md-Me-(96:4)) ergaben 13 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 14–20 (310 mg eluiert mit Md-Me-(96:4)) ergaben aus Aceton-Äther Kristalle vom Smp. 250–262°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther reines 14β,15β-Epoxy-14-anhydro-

digoxigenin ($3\beta, 12\beta$ -Dihydroxy-14, 15 β -epoxy-5 β - $\Delta^{20(22)}$ -cardenolid) (**6**) in Prismen vom Smp. 254–264°. $[\alpha]_D^{24} = +50^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,663$ in Methanol). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{max} = 214 m\mu$ - $\log \epsilon = 4,17$.

$C_{23}H_{32}O_5$ (388,5) Ber. C 71,10 H 8,30% Gef. C 70,86 H 8,28%

6. *Di-O-acetyl-14 β , 15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin* (**7**) aus **6**. 82 mg 14 β , 15 β -Epoxy-14-anhydro-digoxigenin (**6**) vom Smp. 254–264° wurden mit 3 ml abs. Pyridin und 2,7 ml Acetanhydrid 17 St. bei 40° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum vollständig eingedampft und der Rückstand mehrmals mit Benzol im Vakuum abgedampft. Es resultierten 110 mg Rohprodukt, das durch Chromatographie an 5 g Silicagel mit Md-Mc-(98:2) als Lösungsmittel gereinigt wurde. Aus Aceton-Äther 90 mg Kristalle vom Smp. 212–216°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther Prismen vom Smp. 214–217° (Sintern bei 210°). $[\alpha]_D^{28} = +72^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,319$ in Me). Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 2) (fest in KBr) Banden bei 3,31 μ (C–H, Epoxid); 5,77 μ (C=O, Acetyl+Butenolidring); 6,13 μ (C=C, Butenolidring) und 8,13 μ (–O–COCH₃). Nach Smp., Misch-Smp., DC und IR.-Spektrum identisch mit Präparat, das aus **8** bereitet wurde (s. unten).

$C_{27}H_{36}O_7$ (472,6) Ber. C 68,62 H 7,68% Gef. C 68,38 H 7,89%

7. *Di-O-acetyl-14 β , 15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin* (**7**) aus *Di-O-acetyldigoxigenin* (**8**). Eine Lösung von 524 mg **8** vom Smp. 224–228° in 2,6 ml Pyridin wurde bei –40° mit einem auf –40° gekühlten Gemisch von 2,6 ml Pyridin und 0,55 ml SOCl₂ versetzt und 100 Min. bei ca. –15° unter H₂O-Ausschluss stehengelassen. Hierauf wurde mit Eis zerlegt, die Lösung mit 2N H₂SO₄ auf pH 1 gebracht und mit Äther-Chloroform-(3:1) ausgeschüttelt. Nach Waschen mit 2N Na₂CO₃-Lösung und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen resultierte 506 mg farbloses Rohprodukt, das im DC (Fließmittel Äther) praktisch nur einen Fleck zeigte. Aus Aceton-Äther kristallisierten 438 mg *Di-O-acetyl-14-anhydro-digoxigenin* vom Smp. 197–200° und 31 mg vom Smp. 189–195°. Eine Lösung von 200 mg der obigen Kristalle vom Smp. 197–200° in 9 ml Aceton wurden der Vorschrift von HOFER *et al.* [7] entsprechend mit einer Lösung von 140 mg N-Bromacetamid in 2,3 ml Wasser versetzt, worauf die Lösung sich gelb färbte. Nach Stehen während 17 Std. bei 22° hatte sich die Lösung entfärbt; sie wurde nochmals mit einer Lösung von 55 mg N-Bromacetamid in 0,5 ml Wasser versetzt. Nach 5 Std. Stehen wurde mit 7 ml Wasser verdünnt und das Aceton im Vakuum entfernt. Die wässrige Suspension wurde gründlich mit Chloroform ausgeschüttelt, die Auszüge mit 1N NaOH und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt (213 mg) wurde an 200 g Kieselgel nach DUNCAN [12] mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert (100-ml-Fractionen). Die Fraktionen 19–21 lieferten aus Äther und einer Spur Aceton 130 mg Kristalle vom Smp. 206–210°. Nach Umkristallisieren wurde reines *Di-O-acetyl-14 β , 15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin* (**7**) in Prismen vom Smp. 213–216° (Sintern bei 209°) erhalten. $[\alpha]_D^{24} = +72^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,352$ in Methanol). Der Misch-Smp. mit einem Präparat von **7**, das aus **6** erhalten worden war (s. oben), war gleich, ebenso das IR.-Spektrum und die Laufstrecke im DC.

$C_{27}H_{36}O_7$ (472,6) Ber. C 68,62 H 7,68% Gef. C 68,40 H 7,61%

8. *KMnO₄-Abbau von Di-O-acetyl-12 β -hydroxy-resibufogenin* (**5**): $3\beta, 16\beta$ -Diacetoxy-14 $\beta, 15\beta$ -epoxy-5 $\beta, 14\beta$ -ätiensäure-methylester (**9**). 105 mg **5** vom Smp. 155–163°/193–199° wurden in 7 ml frisch über KMnO₄ destilliertem Aceton gelöst und unter Rühren während 4 Std. portionsweise mit insgesamt 230 mg fein gepulvertem KMnO₄ versetzt (am Anfang 125 mg, nach 30 Min. 55 mg und nach 2 Std. 50 mg KMnO₄ zugegeben). Nach 4 Std. war die Lösung immer noch leicht rötlich. Sie wurde im Vakuum vollständig eingedampft, der Rückstand etwas zerrieben, mit 15 ml Wasser versetzt und mit 2N H₂SO₄ auf pH 1 gebracht. Unter Eiskühlung wurde SO₂ in die Suspension bis zur völligen Entfärbung eingeleitet. Die wässrige, farblose Suspension wurde 6mal mit Chloroform-Äther-(3:1) ausgeschüttelt, die Lösungen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das saure Rohprodukt (ca. 100 mg) wurde in 15 ml Äther gelöst und mit einer frisch bereiteten ätherischen Diazomethanlösung im Überschuss versetzt. Nach dem Eindampfen resultierten 95 mg roher Ester, der an 6 g Silicagel grob chromatographiert wurde (25 ml Lösungsmittel pro Fraktion). Die mit Benzol-Chloroform-(4:1) eluierten Fraktionen ergaben ca. 70 mg Rohprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm 2–3 Flecke zeigte, die sehr nahe beieinander lagen (Fließmittel: Äther). Die späteren Fraktionen ergaben noch ca. 20 mg Gemisch (noch Edukt enthaltend), das nicht weiter verarbeitet wurde. Die obigen 70 mg Rohprodukt

wurden an 10 g Kieselgel nach DUNCAN [12] mit Petroläther-Äther (3:7) als Lösungsmittel chromatographiert. (Fraktionen zu 10 ml.) Aus den Fraktionen 4–7 wurden aus Äther-Petroläther 32 mg Kristalle erhalten. Nach Umkristallisieren aus Äther-Petroläther resultierte reiner Ester **9** in verfilzten Nadeln vom Smp. 176–181° (beginnt bei 170° zu sublimieren). $[\alpha]_D^{25} = +32 \pm 2^\circ$ ($c = 0,911$ in Me). Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3) (fest in KBr) Banden bei 3,31 μ (C–H, Epoxid), 5,76 μ (C=O, Ester) und bei 8,10 μ (–O–CO–CH₃). Der Misch-Smp. mit einem Präparat von **9**, das durch Abbau von **7** gewonnen worden war (s. unten) war gleich, ebenso das IR.-Spektrum und die Laufstrecke im DC (Fließmittel: Äther).

9. *Abbau von Di-O-acetyl-14 β ,15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin (7) mit O₃ etc.: 3 β ,12 β -Diacetoxy-14 β ,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-Ätiansäure-methylester (9)*. In eine Lösung von 125 mg **7** vom Smp. 203–212° in 10 ml Essigester (getrocknet durch Filtrieren durch eine Säule mit basischem Al₂O₃) wurde während 10 Min. bei –70° ein 4-proz. O₃/O₂-Gemisch eingeleitet (Geschwindigkeit 100 ml/Min.). Die violettblaue Lösung war auch nach Stehen in der Kälte während 90 Min. noch blau und wurde dann kurz auf 0° erwärmt, worauf sie sich sofort entfärbte. Die wieder auf –70° gekühlte Lösung wurde nochmals während 5 Min. mit dem O₃/O₂-Strom behandelt (Geschwindigkeit 200 ml/Min.) und hierauf 45 Min. in der Kälte stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum bei –10° wurde das rohe Ozonid in 3 ml Eisessig gelöst und mit einem Tropfen H₂O sowie mit Zn-Staub in kleinen Portionen versetzt (leichte Erwärmung). Nach 5 Min. wurde feuchtes KJ-Stärkepapier von der Reaktionslösung nicht mehr gefärbt. Nach 10 Min. wurde filtriert, der Rückstand mit Chloroform nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Md aufgenommen und mit wenig Wasser neutral gewaschen. Das nach Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen resultierende Rohprodukt (120 mg) wurde in 15 ml Me gelöst und mit einer kalt zubereiteten Lösung von 230 mg KHCO₃ in 6 ml H₂O versetzt. Nach 20 Std. Rühren bei 22° wurde das Me im Vakuum entfernt und die wässrige Suspension mit Chloroform-Äther-(9:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten 92 mg Rohprodukt (Ketol), das in 16 ml reinstem Me gelöst und mit 16,5 ml NaJO₄-Lösung (zu einer Suspension von 625 mg NaJO₄ in 50 ml Wasser wurden einige Tropfen 2N H₂SO₄ gegeben; pH = 1,5–1,8) versetzt wurde. Nach 3 Std. Stehen im Dunkeln bei 22° wurde das Me im Vakuum entfernt, die Lösung mit 2N H₂SO₄ auf pH 1 gebracht und viermal mit Chloroform-Äther-(3:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten ca. 100 mg rohe Ätiansäure, die in Äther gelöst und mit einem knappen Überschuss an frisch bereiteter ätherischer Diazomethanlösung versetzt wurde. Nach 15 Min. Stehen wurde eingedampft. Da der rohe Methylester (92 mg) im DC beträchtliche Mengen eines langsamer laufenden Nebenprodukts zeigte, wurde er mit 2,5 ml Acetanhydrid in 3 ml Pyridin versetzt und 16 Std. bei 35° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen des Rückstandes in Chloroform, Waschen der Lösung mit 2N HCl, 2N Na₂CO₃-Lösung und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum war im DC der Fleck des Nebenprodukts verschwunden. Das Rohprodukt (ca. 100 mg) wurde nach DUNCAN [7] an 70 g Kieselgel mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert. (Fraktionen zu 30 ml.) Die Fraktionen 9–11 ergaben aus Äther 60 mg Kristalle vom Smp. 177–183°. Nach Umkristallisieren aus Äther resultierte reiner Ester **9** in fein verfilzten Nadeln vom Smp. 182–184° (Sublimieren ab 170°). $[\alpha]_D^{25} = +32 \pm 2^\circ$ ($c = 1,239$ in Chloroform). Das IR.-Spektrum (in CH₂Cl₂) zeigte Banden bei 5,76 μ (C=O, Ester) und 8,10 μ (–O–CO–CH₃). In KBr war die Bande bei 3,31 μ erkennbar. Der Misch-Smp. mit einem Präparat von **9**, das durch Abbau von **5** gewonnen worden war (s. oben), war gleich, ebenso das Verhalten im DC.

C₂₅H₃₆O₇ (448,54) Ber. C 66,94 H 8,09% Gef. C 67,07 H 8,15%

10. *3 β ,12 β ,14,20-Tetrahydroxy-21-nor-5 β ,14 β -pregnan (10) (Tetrol 10) aus 3 β ,12 β -Diacetoxy-14-hydroxy-5 β ,14 β ,17 α H-Ätiansäure-methylester (12)*. Eine Lösung von 200 mg Methylester **12** vom Smp. 185–189° in 25 ml trockenem Tetrahydrofuran-Äther-(1:1) wurde zu einer Suspension von 400 mg LiAlH₄ in 25 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches getropft. Nach 3 Std. Kochen unter Rückfluss wurde das überschüssige LiAlH₄ mit Eis zerstört, 2N H₂SO₄ bis zur kongosauren Reaktion zugegeben und die Ätherphase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde noch viermal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Äther-Chloroform-Extrakte wurden mit wenig Wasser neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten 120 mg Rohprodukt, das aus Aceton 106 mg Kristalle lieferte. Nach Umkristallisieren reines Tetrol **10** vom Smp. 247–

250°. $[\alpha]_D^{24} = +2 \pm 2^\circ$ ($c = 1,210$ in Methanol). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte eine breite, nicht aufgelöste Bande bei 2,96–3,07 μ . (H–O–) und keine C=O-Schwingungen.

$C_{20}H_{34}O_4$ (338,47) Ber. C 70,97 H 10,13% Gef. C 69,90 H 10,10%

11. $3\beta, 12\beta, 14, 20$ -Tetrahydroxy-21-nor-5 $\beta, 14\beta$ -pregnan (**10**) (Tetrol **10**) aus $3\beta, 12\beta$ -Diacetoxy-14,15 β -epoxy-5 $\beta, 14\beta, 17\alpha$ H-ätiensäure-methylester (**9**). Eine Lösung von 35 mg **9** vom Smp. 177–183° in 10 ml frisch über basischem Al_2O_3 gereinigtem Äther wurde unter Rühren mit 100 mg $LiAlH_4$ versetzt. Nach 3 Std. Kochen unter Rückfluss wurde das überschüssige $LiAlH_4$ unter Kühlung mit Eis zersetzt und 2N H_2SO_4 bis zur kongosauren Reaktion zugesetzt. Nach Ausschütteln mit Chloroform, Waschen der Auszüge mit wenig Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten 33 mg Rohprodukt. Aus Aceton 14 mg Kristalle vom Smp. 220–242°, die aber laut DC (Fließmittel Md-Me-(85:15)) nicht ganz einheitlich waren. Nach Umkristallisieren aus Aceton wurden 11 mg reines Tetrol **10** vom Smp. 235–247° erhalten. Der Misch-Smp. mit dem aus **12** erhaltenen Präparat war gleich, ebenso die Laufstrecke im DC.

12. $3\beta, 12\beta, 20$ -Triacetoxy-14-hydroxy-21-nor-5 $\beta, 14\beta$ -pregnan (**11**) aus **10**. Eine Lösung von 50 mg Tetrol **10** vom Smp. 247–250° in 1,2 ml abs. Pyridin und 1,0 ml Acetanhydrid wurde 17 Std. bei 40° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand noch 5mal mit Benzol abgedampft. Die 78 mg Rohprodukt wurden an 5 g Silikagel mit Md-Me-(98:2) als Lösungsmittel chromatographiert. Aus Aceton-Äther wurden 57 mg Kristalle vom Smp. 163–166° erhalten. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther reines **11** in Quadern vom Smp. 164–166°. $[\alpha]_D^{24} = +29 \pm 2^\circ$ ($c = 1,437$ in Me). Das IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) zeigte Banden bei 2,46 μ (HO); 5,76 μ (C=O, Ester) und 8,05 μ (–O–CO– CH_3).

$C_{26}H_{40}O_7$ (464,6) Ber. C 67,21 H 8,68% Gef. C 66,99 H 8,65%

SUMMARY

Incubation of resibufogenin (**1**) with cultures of *Fusarium lini* (BOLLEY) yielded the unknown 12 β -hydroxyresibufogenin (**4**). The structure of **4** was proved by the degradation of its diacetyl derivative **5** to methyl 3 $\beta, 12\beta$ -diacetoxy-14 $\beta, 15\beta$ -epoxy-5 $\beta, 14\beta, 17\alpha$ H-etianate (**9**) which was identical with the degradation product obtained from 14 $\beta, 15\beta$ -epoxy-14-anhydro-digoxigenin diacetate (**7**). The latter was prepared from di-O-acetyl digoxigenin (**8**). Incubation of 14 $\beta, 15\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (**2**) with *F. lini* led to the 12 β -hydroxy derivative **6**, its diacetate being identical with **7**. $LiAlH_4$ -reduction of both the epoxyester **9** and the hydroxyester **12** derived from digoxigenin gave the same tetrol **10**.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 11. Mitteilung: E. WEISS-BERG & CH. TAMM, *Helv.* **46**, 2435 (1963).
- [2] Internat. Symposium Chemistry Nat. Products, Kyoto 1964, Abstr. Papers, p. 285.
- [3] CH. TAMM, *Angew. Chem.* **74**, 225 (1962); *ibid.* Internat. Edit. in English **1**, 178 (1962); Y. NOZAKI, *Agr. biol. Chemistry (Jap.)* **25**, 461, 559, 879, 884, 890 (1961); Y. NOZAKI, E. MASUO & D. SATOH, *ibid.* **25**, 399 (1962); H. ISHII, Y. NOZAKI, T. OKUMURA & D. SATOH, *Chem. & pharmaceut. Bull. (Jap.)* **11**, 156 (1963); T. OKUMURA, Y. NOZAKI & D. SATOH, *ibid.* **11**, 1340 (1963); P. BELLET & D. GÉRARD, *Ann. pharmaceut. franc.* **27**, 593 (1963).
- [4] CH. TAMM & A. GUBLER, *Helv.* **42**, 473 (1959).
- [5] CH. TAMM, A. GUBLER, G. JUHASZ, E. WEISS-BERG & W. ZÜRCHER, *Helv.* **46**, 889 (1963); E. WEISS-BERG & CH. TAMM, *Helv.* **46**, 1166 (1963).
- [5a] M. S. RAGAB, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **45**, 1794 (1962).
- [6] a) K. MEYER, *Helv.* **35**, 2444 (1952); b) H. LINDE & K. MEYER, *Pharmac. Acta Helv.* **33**, 327 (1958); *Helv.* **42**, 807 (1959).
- [7] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **45**, 1041 (1962).

- [8] A. WINDAUS & G. STEIN, Ber. deutsch. Chem. Ges. 67, 2436 (1928); F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, Helv. 28, 1472 (1945).
- [9] a) S. SMITH, J. chem. Soc. 1930, 508; b) M. STEIGER & T. REICHSTEIN, Helv. 27, 828 (1938); c) S. PATAKI, K. MEYER & T. REICHSTEIN, Helv. 36, 1295 (1953).
- [10] H. HENBEST, G. D. MEAKINS, D. NICHOLLS & K. J. TAYLOR, J. Chem. Soc. 1957, 1459; H. SCHRÖTER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. 47, 720 (1958); vgl. auch [6].
- [11] T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Discuss. Farad. Soc. Nr. 7, 305 (1949).
- [12] G. R. DUNCAN, J. Chromatogr. 8, 37 (1962).
- [13] Vgl. E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962; K. RANDEKATH, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1962.
- [14] 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).

249. Umwandlung von Krötengiften (Bufadienoliden) durch Mikroorganismen

III. 12 β -Hydroxymarinobufagin¹⁾

13. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]²⁾

von M. Schüpbach und Ch. Tamm

(14. X. 64)

Mit Hilfe mikrobieller Enzyme ist es möglich, neue Bufadienolidderivate zu bereiten, die man auf rein chemischem Wege nicht oder nur über sehr viele Stufen synthetisieren kann. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese neuen Verbindungen oder von ihnen abgeleitete Ester und Glykoside später auch in tierischen oder pflanzlichen Materialien entdeckt werden, womit ihre Identifizierung vereinfacht ist. Ausserdem können diese neuen Stoffe unsere Kenntnisse über die Beziehungen zwischen Konstitution und biologischer Wirksamkeit vertiefen. Nachdem wir in der vorausgegangenen Mitteilung [1] über die 12 β -Hydroxylierung von Resibufogenin mit Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) berichtet hatten, beschreiben wir jetzt die Resultate, die bei der Inkubation von Marinobufagin (1) mit dem gleichen Organismus erzielt wurden³⁾. Marinobufagin (1) unterscheidet sich von Resibufogenin lediglich durch eine zusätzliche Hydroxygruppe an C-5 [2].

Da nach den bisherigen Erfahrungen [3] die Hydroxylierungsgeschwindigkeiten mit zunehmender Zahl von HO-Gruppen rasch abnehmen, war es nicht verwunderlich, dass auch bei 1 mit *F. lini* nur eine sehr langsame Reaktion stattfand. Erst bei Zusatz von KCN zur Nährlösung (10⁻³M KCN) trat in Analogie zu früheren Beobachtungen [4] eine befriedigende Umsetzung ein. Sie wurde wie üblich unter Belüftung in Schüttelkulturen bei 27° vorgenommen. Nach 17 Tagen zeigte das Dünnschichtchromato-

¹⁾ Über diese Untersuchungen wurde am «International Symposium on the Chemistry of Natural Products», Kyoto, Japan, 12.-18. April 1964, berichtet [1a].

²⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2233.

³⁾ Wir möchten Herrn Prof. Dr. KUNO MEYER, Basel, erneut für die grosszügige Überlassung einer grösseren Menge Marinobufagin danken.