

- [14] A. D. ARGOUDELIS, R. R. HERR, D. J. MASON, D. R. PYKE & J. F. ZIESERL, *Biochemistry* **6**, 165 (1967).  
 [15] L. J. HANKA, *J. Bacteriol.* **80**, 30 (1960).  
 [16] L. SLECHTA, *Biochem. Pharmacol.* **5**, 96 (1960).  
 [17] G. A. FISCHER & J. J. KABARA, *Analyt. Biochemistry* **9**, 303 (1964).  
 [18] P. Onnertz, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **34**, 3735 (1902).  
 [19] C. SCHALL, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **12**, 823 (1879).

### 13. Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen VI.

#### **7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin und Abbau von 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin zum 3 $\beta$ , 7 $\beta$ -Diacetoxy-14-hydroxy-5 $\beta$ , 14 $\beta$ , 17 $\alpha$ H- $\beta$ -tiansäure-methylester**

15. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]

von **M. Scherrer-Gervai**, **L. Gsell** und **Ch. Tamm**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

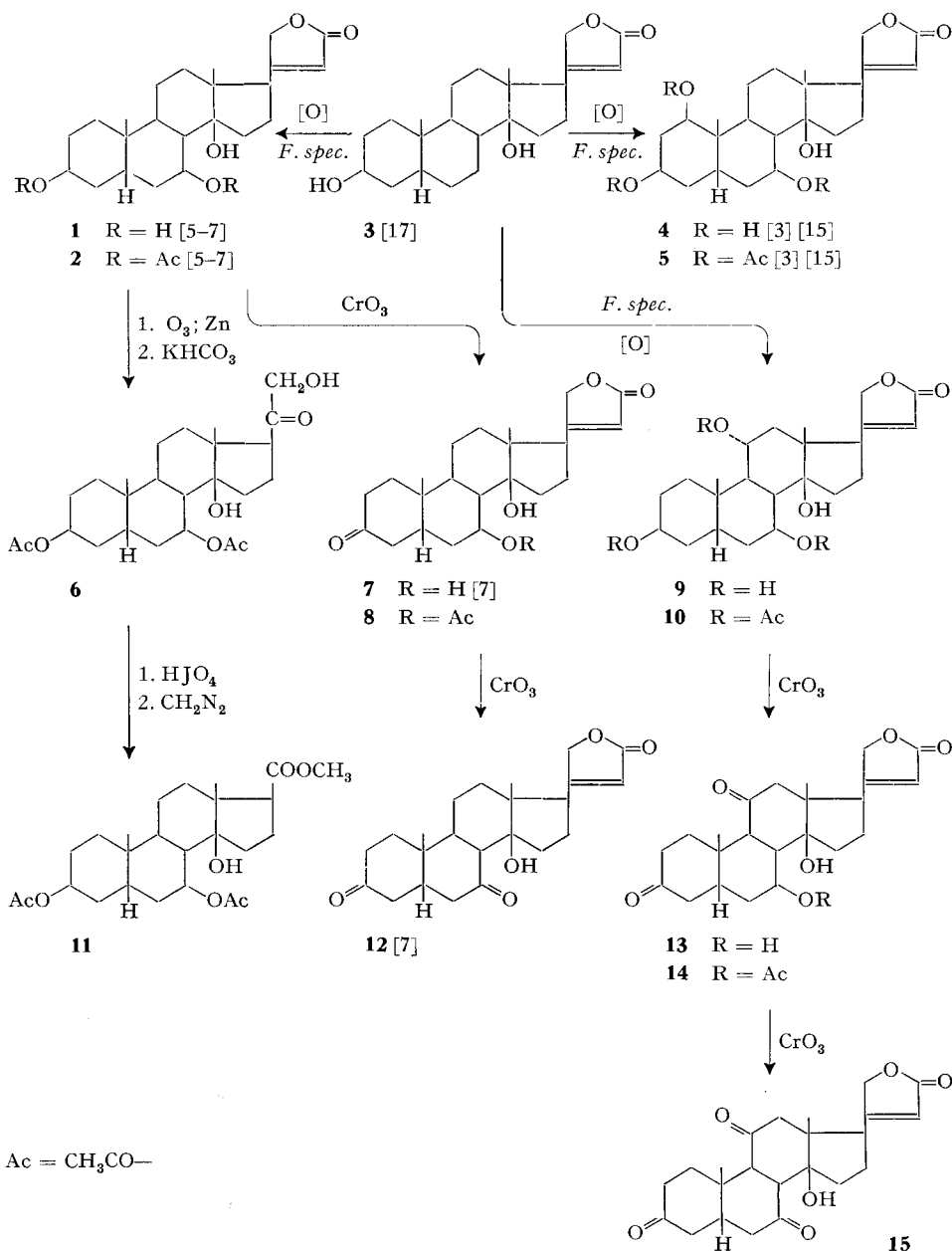
(3. XII. 68)

*Summary.* Digitoxigenin (**3**) was transformed by a *Fusarium spec.* to 7 $\beta$ -hydroxydigitoxigenin (**1**), 1 $\beta$ , 7 $\beta$ -dihydroxydigitoxigenin (**4**) and to the hitherto unknown 7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxydigitoxigenin (**9**). 7 $\beta$ -acetoxy-digitoxigenin (**2**) was degraded to methyl 3 $\beta$ , 7 $\beta$ -diacetoxy-14-hydroxy-5 $\beta$ , 14 $\beta$ , 17 $\alpha$ H- $\beta$ -tiansäure (**11**).

Während es heute möglich ist, in nahezu alle Stellungen des Androstan- und Pregnangerüsts mit Hilfe von Mikroorganismen Hydroxylgruppen einzuführen, sind in der Cardenolidreihe analoge Hydroxylierungen erst an einer beschränkten Zahl von C-Atomen realisiert worden [2]. Bei Digitoxigenin, dem einfachsten Vertreter der digitaloiden Lactone, hat man bisher Monohydroxylierungen in den Stellungen 1 $\beta$  [3], 5 $\beta$  [3] [4], 6 $\beta$  [5], 7 $\beta$  [3] [6–10], 11 $\alpha$  [5] [11], 12 $\beta$  [9] [12–14] und 16 $\beta$  [13] sowie Dihydroxylierungen in den Stellungen 1 $\beta$ , 7 $\beta$  [3] [15] und 5 $\beta$ , 7 $\beta$  [3] [15] beobachtet.

Im folgenden berichten wir über die Umsetzung von Digitoxigenin (**3**) mit einer *Fusarium spec.* (Stamm S33). Sie wurde wie üblich aerob in Schüttelkulturen bei 25–27° vorgenommen.

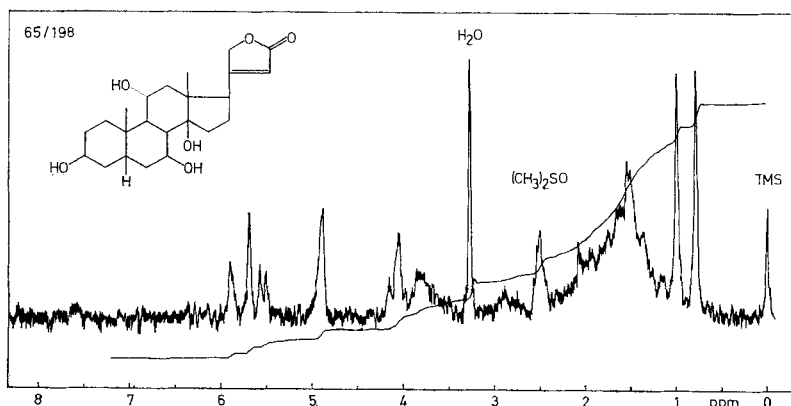
Es resultierten drei Produkte, die nach chromatographischer Reinigung in einheitlichen Kristallen isoliert wurden. Das Hauptprodukt vom Doppel-Smp. 249–252°/268–275° war nach Misch-Smp. mit einer authent. Probe, IR.-Spektrum, spez. Drehung und Laufstrecke im Dünnschichtchromatogramm mit dem bekannten 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin (**1**) [5–7] identisch. Die CrO<sub>3</sub>-Oxydation ergab die 3-Dehydro- und 3,7-Bisdehydro-Derivate **7** und **12**, deren physikalische Daten ebenfalls mit den Angaben in der Literatur [7] übereinstimmten. Auch das NMR.-Spektrum von **1** zeigte alle charakteristischen Signale (s. exper. Teil). – Beim zweiten Stoff vom Smp. 256–261°, der in etwas kleinerer Menge anfiel, handelt es sich auf Grund aller oben genannten Kriterien um das bekannte 1 $\beta$ , 7 $\beta$ -Dihydroxydigitoxigenin (**4**) [3] [15]. Auch die Eigenschaften des Di-O-acetylderivats **5** stimmten mit denjenigen



eines authent. Präparats überein<sup>1)</sup>). Der dritte Stoff vom Smp. 267-270° ist ein neues Dihydroxylierungsprodukt des Digitoxigenins. Auf Grund seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften kommt ihm höchstwahrscheinlich die Konstitution des

<sup>1)</sup> Für die Überlassung einer Vergleichsprobe danken wir Herrn Dr. D. SATOH, SHIONOGI & Co. LTD., Osaka, Japan.

7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenins (**9**) zu. Wegen der geringen Mengen konnte der endgültige Beweis noch nicht erbracht werden. Die Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin ergab das Tri-O-acetylderivat **10**. Oxydation mit CrO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Aceton [16] lieferte das 3,11-Bisdehydroderivat **13**, das sich in das Mono-O-acetylderivat **14** überführen liess, sowie das Triketon **15**. Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, dass die beiden neuen Hydroxylgruppen sekundär sind. Das in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO gemessene NMR.-Spektrum (vgl. Fig.) zeigte bei 0,79 und 1,00 ppm die Signale der 18- resp. 19-Methylgruppe. Bei 5,56 ppm erschien das Singulett der 14 $\beta$ -Hydroxygruppe. Das Dublett bei 5,54 ppm ( $J = 5$  Hz) ordnen wir der 7 $\beta$ -Hydroxygruppe und die Signale bei 4,05 und 4,14 ppm den 3 $\beta$ - und 11 $\alpha$ -HO-Gruppen zu. Bei den zwischen 3,5 und 4,0 ppm erscheinenden drei Signalen handelt es sich um die drei  $\alpha$ -Protonen der Hydroxylgruppen. Die Signale bei 4,90 und 5,88 ppm stammen vom Butenolidring her. Das NMR.-Spektrum bestätigt somit die sekundäre Natur der beiden mikrobiologisch geführten HO-Gruppen. Für die Zuordnung der 7 $\beta$ - und 11 $\alpha$ -Stellung sprechen die folgenden Befunde: Im NMR.-Spektrum einer Lösung von **9** in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO sind die Signale der 14 $\beta$ -HO-Gruppe und eine der beiden neuen sekundären HO-Gruppen nach tieferem Feld verschoben, was auf eine koaxiale Hydroxygruppe in 3-Stellung zur 14 $\beta$ -HO-Gruppe hinweist [18]. Sowohl 3-Dehydro-7 $\beta$ -hydroxy-digitoxigenin (**7**) als auch das Bisdehydroderivat **13** weisen dieselben Signale von Hydroxylgruppen mit praktisch gleichen chemischen Verschiebungen auf, und da sich bei der Oxydation von **9** kein Fünfringketon gebildet hatte, fällt die 16-Stellung für die sekundäre HO-Gruppe ausser Betracht. Eine 12 $\beta$ -ständige HO-Gruppe kann wegen der leichten Acetylierung und des NMR.-Spektrums ebenfalls ausgeschlossen werden. Infolgedessen befindet sich eine HO-Gruppe in 7 $\beta$ -Stellung. Das neue Dihydroxylierungsprodukt besitzt weder eine Glykolgruppe noch eine weitere 1,3-Diolgruppe und somit kommt für die zweite mikrobiologisch eingeführte HO-Gruppe nur die 11-Stellung in Frage.



NMR.-Spektrum von 7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin (**9**) in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sup>2)</sup>.

<sup>2)</sup> Aufgenommen mit einem VARIAN-Spektrometer A-60 (60 MHz) im Spektrollaboratorium unseres Instituts (K. AEGERTER). Chemische Verschiebungen in  $\delta$ -Werten, bezogen auf  $\delta = 0$ , für Tetramethylsilan.

Die leichte Acetylierbarkeit schliesst die  $\beta$ -Konfiguration aus. Die Zuordnung der 11 $\alpha$ -Stellung ergab sich aus der Berechnung des Einflusses dieser Hydroxygruppe auf die magnetischen Resonanzfrequenzen der 18- und der 19-Methylgruppe (s. Tabelle).

Die errechneten Beiträge der zur Diskussion stehenden Hydroxylgruppe stimmen sehr gut für die 11-Stellung mit  $\alpha$ -Konfiguration. Mit der 12 $\alpha$ -Stellung sind sie aber

*Berechnung der chemischen Verschiebung der 18- und der 19-Methylgruppe in 7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin (9) (in ppm) in (CD<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>*

Substanz	C-19	C-18
Digitoxigenin (3)	0,875	0,770
Beitrag von 7 $\beta$ -OH [18]	0,030	0,030
Summe	0,905	0,800
Gef. bei 7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin (9)	1,000	0,790
Ber. Beitrag der unbekanntenen HO-Gruppe	+ 0,095	- 0,010

unvereinbar. Diese Berechnungen stützen sich auf eine umfangreiche Untersuchung an zahlreichen Modellsstoffen [18].

Zum Schluss möchten wir noch den Abbau des Di-O-acetyl-7 $\beta$ -digitoxigenins (2) mit Ozon usw. erwähnen. (Zur Methodik vgl. [19].) Das nach der Behandlung von 2 mit dem O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>-Gemisch und Zn in Eisessig entstandene intermediäre Ketol 6 wurde nicht isoliert, sondern direkt mit HJO<sub>4</sub> oxydiert und die gebildeten sauren Anteile mit Diazomethan verestert. Es resultierte der noch unbekannt krist. 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Diacetoxy-14-hydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-methylester (11). Mit Hilfe dieses Abbauprodukts lassen sich weitere 7-oxygenierte Steroide in einfacher Weise mit 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin (1) verknüpfen.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG (Projekt Nr. 2535 und 3976) für die finanzielle Unterstützung.

### Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert, Fehlergrenze etwa  $\pm 2^\circ$ . Substanzproben zur Messung der spez. Drehungen und Spektren wurden ca. 5 Std. bei 60–70°/0,02 Torr und zur Elementaranalyse 12 Std. bei 100°/0,02 Torr getrocknet. Die Elementaranalyse verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (E. THOMMEN). Die IR.-Spektren wurden entweder mit dem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, oder mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell IR-8, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A-60, im Spektrollaboratorium des Instituts (K. AEGERTER und W. SCHWAB) aufgenommen. Zur Säulenchromatographie dienten Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Aktivitätsstufe II–III), Kieselgel (Korngrösse 0,05–0,20 mm) nach DUNCAN [20] und Silicagel (Korngrösse 0,15–0,33 mm). Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) nach STAHL (vgl. [21]) wurden Kieselgel G als Adsorbens und J<sub>2</sub>-Dämpfe zum Sichtbarmachen der Flecke verwendet. Abkürzungen: Ae = Äther, Be = Benzol.

2. *Kultur der Mikroorganismen.* Kulturproben einer Schrägagarkultur von *Fusarium sp.* S33<sup>3)</sup> wurden direkt als Impfmateriale für die Nährlösung verwendet. Zum Versuch wurden 500-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 100 ml Nährlösung benutzt. Die Gefässe wurden 30 Min. bei 120° im Dampfautoklav sterilisiert und dann beimpft. Die ERLENMEYER-Kolben wurden auf einer rotie-

<sup>3)</sup> Wir danken Herrn Dr. CH. STOLL, SANDOZ AG, Basel, bestens für die Überlassung dieser Kultur.

renden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) bei 27° 17 Tage inkubiert, worauf das in Aceton gelöste Substrat zugegeben wurde.

*Nährlösung* nach RICHARD: 50 g Glucose; 10 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g  $\text{FeCl}_3$  mit dest. Wasser *ad* 1000 ml; pH 4,4 bis 4,7 (nicht eingestellt).

3. *Umsetzung von Digitoxigenin (3) mit Fusarium sp. (S.33)*. Eine Lösung von 1,2 g Digitoxigenin (3) vom Smp. 246–253° in 180 ml Aceton wurde gleichmässig auf 30 500-ml-ERLENMEYER-Kolben verteilt. Hierauf wurde 17 Tage bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt, dann jeder Kolben mit 25 ml Methanol versetzt und 1 Std. stehengelassen. Es wurde abgutscht und der Mycelrückstand mit Methanol nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum vom Methanol befreit und zweimal mit dem gleichen Volumen Methylenchlorid, darnach zweimal mit dem gleichen Volumen Methylenchlorid-Äthanol-(4:1) ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser, Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Eindampfen resultierten 1,75 g Rohprodukt, das im DC. (Fließmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ -(9:1)) zwei starke Flecke von Digitoxigenin (3) und 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin (1) sowie mehrere schwache Flecke mit kleineren Rf-Werten zeigte. Das Rohprodukt wurde an 60 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 200 ml Lösungsmittel pro Fraktion.

Die Fraktionen 1–7 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ergaben 38 mg Öl, verworfen.

Die Fraktionen 8–11 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ergaben 546 mg rohes Digitoxigenin (3), das nach Umkristallisieren aus  $\text{CH}_3\text{OH}$ -Ae 260 mg Kristalle vom Smp. 242–245° lieferte.

Die Fraktionen 12–27 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bis  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$  (99,5:0,5)) ergaben 211 mg amorphes Material, das zur Hauptsache Digitoxigenin (3) und wenig 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin (1) enthielt.

Die Fraktion 28 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ -(99,5:0,5)) ergab 23 mg nicht ganz reines 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin (1), das für die Acetylierung verwendet wurde.

Die Fraktionen 29–31 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ -(99,5:0,5 bis 99:1)) ergaben aus An-Ae 112 mg Kristalle vom Smp. 249–252°. Nach Umkristallisieren resultierte reines 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin (1) vom Smp. 268–275°.  $[\alpha]_D^{25} = +33^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,053$  in Me). Das IR.-Spektrum stimmt mit dem IR.-Spektrum eines Präparats, das durch Hydroxylierung von Digitoxigenin (3) mit *A. oryzae* erhalten worden war [7], überein. Das NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  zeigte Signale bei 0,90 und 0,80 ppm (19-Methyl und 18-Methyl); 4,15 ppm (Dublett;  $J = 4$  Hz: 3 $\beta$ -OH); 5,47 ppm (Dublett;  $J = 6$  Hz: 7 $\beta$ -OH); 5,41 ppm (14 $\beta$ -OH); 3,8 und 3,7 ppm ( $\alpha$ -Protonen der HO-Gruppen); 4,92 und 5,93 ppm (Butenolidring).

Die Fraktionen 32–33 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ -(99:1)) ergaben 59 mg nicht ganz reines 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin.

Die Fraktionen 34 und 35 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl-CH}_3\text{OH}$ -(98:2)) ergaben 90 mg DC.-einheitliches Produkt, das aus An-Ae 49 mg Kristalle vom Smp. 243–245° lieferte. Nach Umkristallisieren aus  $\text{CH}_3\text{OH}$ -An reines 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxydigitoxigenin (4) vom Smp. 256–261°.  $[\alpha]_D^{25} = +22^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,95$  in  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte Banden bei 3400  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 1770 und 1730  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, Butenolidring) und 1530  $\text{cm}^{-1}$  (C=C, Butenolidring) und ist identisch mit dem IR.-Spektrum einer authent. Probe von 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxydigitoxigenin [3] [15]. Das NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  zeigte Signale bei: 1,005 und 0,80 ppm (19-Methyl und 18-Methyl); 5,52 ppm (Dublett;  $J = 5$  Hz: 7 $\beta$ -OH); 5,43 ppm (14 $\beta$ -OH); 5,10 (breit: 1 $\beta$ -OH); 5,10 ppm (breit: 3 $\beta$ -OH); 3,5–4,0 ppm ( $\alpha$ -Protonen der HO-Gruppen); 4,94 und 5,87 ppm (Butenolidring).

$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_6$  (406) Ber. C 67,95 H 8,43% Gef. C 68,17; 67,57 H 8,48; 8,70%

Die Fraktionen 36 und 37 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ -(98:2)) ergaben 43 mg amorphes Material, das nach DC. neben 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxydigitoxigenin (4) vor allem 7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin (9) enthielt.

Die Fraktionen 38–50 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ -(98:2 bis 50:50)) ergaben 86 mg DC.-uneinheitliches Substanzgemisch, das nicht mehr weiter untersucht wurde.

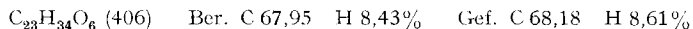
4. *Chromatographische Trennung des Gemisches von 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxydigitoxigenin (4) und 7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin (9)*. 280 mg amorphes Material der obigen Chromatographie, das nach DC. neben wenig 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin (1) vor allem 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxydigitoxigenin (4) und 7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin (9) enthielt, wurde an 125 g Kieselgel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 50 ml Lösungsmittel.

Die Fraktionen 1-3 (eluiert mit Be-CH<sub>3</sub>OH-(95:5)) ergaben 58 mg Öl, das nach DC. wenig 7β-Hydroxydigitoxigenin (**1**) und 1β,7β-Dihydroxydigitoxigenin (**4**) enthielt; verworfen.

Die Fraktionen 4-13 (eluiert mit Be-CH<sub>3</sub>OH-(95:5)) ergaben 97 mg amorphes Material, das aus Me 55 mg krist. 1β,7β-Dihydroxydigitoxigenin (**4**) vom Smp. 245-250° lieferte.

Die Fraktionen 14 und 15 (eluiert mit Be-CH<sub>3</sub>OH-(95:5)) ergaben 9 mg amorphes Material, das nach DC. gleichviel 1β,7β-Dihydroxydigitoxigenin (**4**) und 7β,11α-Dihydroxydigitoxigenin (**9**) enthielt.

Die Fraktionen 16-23 (eluiert mit Be-CH<sub>3</sub>OH-(92,5:7,5)) ergaben 97 mg amorphes Material, das im DC. nur einen Fleck zeigte und aus CH<sub>3</sub>OH 68 mg Kristalle vom Smp. 265-268° lieferte. Umkristallisieren aus CH<sub>3</sub>OH ergab reines 7β,11α-Dihydroxydigitoxigenin (**9**) vom Smp. 267-270°.  $[\alpha]_D^{25} = +40^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,499$  in CH<sub>3</sub>OH). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte 2 scharfe und 2 weniger scharfe Banden bei 3520 und 2410 cm<sup>-1</sup> bzw. 3260 und 3300 cm<sup>-1</sup> (HO-Gruppen). NMR.-Spektrum vgl. Fig.



Die Fraktionen 24-27 (eluiert mit Be-CH<sub>3</sub>OH-(9:1)) lieferten noch 5 mg amorphes Material; nicht weiter untersucht.

5. *Di-O-acetyl-7β-hydroxy-digitoxigenin (2) aus (1)*. 308 mg 7β-Hydroxydigitoxigenin (**1**) vom Smp. 268-275° wurden wie früher beschrieben [7] mit Acetanhydrid-Pyridin behandelt. Nach Eindampfen im Vakuum - zuletzt nach Zugabe von Benzol - resultierte 325 mg Rohprodukt, das an 25 g Silicagel mit Äther gereinigt wurde. Aus Petroläther-Äther 209 mg krist. Di-O-acetyl-7β-hydroxy-digitoxigenin vom Smp. 170-172°. Nach Misch-Smp., DC. und IR.-Spektrum identisch mit einem authent. Präparat [7].

6. *3-Dehydro-7β-hydroxy-digitoxigenin (7) und 3,7-Bisdehydro-7β-hydroxy-digitoxigenin (12) aus 1* (vgl. [7]). Eine Lösung von 40 mg nicht ganz reinem 7β-Hydroxydigitoxigenin (**1**) vom Smp. 260-265° in 20 ml Aceton und mit 1,7 ml CrO<sub>3</sub>-Lösung<sup>4)</sup> wurde 4 Min. bei 20° stehengelassen. Darauf wurden 30 ml Wasser zugegeben und das Aceton im Vakuum entfernt. Die wässrige Lösung wurde 5mal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit 2N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und Wasser, Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen im Vakuum resultierten 41 mg Rohprodukt, das im DC. neben Edukt zwei schneller laufende Flecke zeigte. Das Rohprodukt wurde daher nochmals in 10 ml Aceton gelöst, mit 1,2 ml CrO<sub>3</sub>-Lösung 10 Min. bei 20° stehengelassen und darauf wie oben aufgearbeitet: 38 mg Rohprodukt, das an 20 g Kieselgel chromatographiert wurde. Als Elutionsmittel diente eine Lösung von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH-(94:6) in Fraktionen zu 5 ml.

Die Fraktion 1 ergab 0,5 mg Öl; verworfen.

Die Fraktionen 2 und 3 ergaben 6,9 mg amorphes Material, das im DC. nicht ganz einheitlich war und wie unten beschrieben weiter gereinigt wurde.

Die Fraktionen 4 und 5 (21 mg) lieferten aus An-Ae 9 mg 3-Dehydro-7β-hydroxy-digitoxigenin (**7**) vom Smp. 250-255°. Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte Banden bei 3375 cm<sup>-1</sup> (-OH, intensiv); 1730 cm<sup>-1</sup> und 1707 cm<sup>-1</sup> (Ketobanden); 1609 cm<sup>-1</sup> (C=C). Das NMR.-Spektrum in (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO zeigte Signale bei: 0,83 und 0,98 ppm (18-Methyl und 19-Methyl); 5,64 ppm (Dublett;  $J = 5$  Hz; 7β-OH); 5,36 ppm (Singulett; 14β-OH); 5,95 und 4,98 ppm (Butenolidring).

Die Fraktionen 7-12 ergaben 5 mg Substanz, die nach DC. neben wenig 3-Dehydro-7β-hydroxy-digitoxigenin (**7**) vor allem 7β-Hydroxydigitoxigenin (**1**) enthielt.

Die Mutterlaugen der Fraktionen 4 und 5 sowie die Fraktionen 3 und 4 wurden zusammen mit dem aus der obigen NMR.-Spektren-Lösung zurückgewonnenen Material nochmals an 25 g Kieselgel chromatographiert, wobei mit Methylenchlorid, das steigende Mengen Methanol enthielt, eluiert wurde (Fraktionen zu 12,5 ml).

Die Fraktionen 1-15 (eluiert mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH-(99:1) und (98:2)) ergaben 2 mg Öl; verworfen.

Die Fraktionen 16-25 (eluiert mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH-(98:2)) ergaben 8,3 mg amorphes Material, das aus Aceton-Äther 4 mg krist. 3,7-Bisdehydro-7β-hydroxy-digitoxigenin (**12**) vom Smp. 250-255° lieferte.

Die Fraktionen 26-36 (14 mg, eluiert mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH-(97:3)) ergaben aus Aceton 3-Dehydro-7β-hydroxy-digitoxigenin (**7**) vom Smp. 248-255°.

<sup>4)</sup> CrO<sub>3</sub>-Lösung nach [16]: 2,67 g CrO<sub>3</sub> + 2,30 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Wasser ad 10 ml.

Die Fraktionen 37–50 (eluiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_3\text{OH}$ -(97:3)) ergaben 7,6 mg unreines Material, das noch 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin (**1**) enthielt.

7. 3-Dehydro-7 $\beta$ -acetoxy-digitoxigenin (**8**) aus **7**. 2 mg 3-Dehydro-7 $\beta$ -hydroxy-digitoxigenin (**7**) vom Smp. 248–255° wurden mit 0,05 ml Acetanhydrid und 0,05 ml Pyridin 24 Std. bei 35° stehengelassen. Nach Eindampfen der Lösung im Vakuum, zuletzt unter Zusatz von Benzol, und Reinigung an wenig Kieselgel resultierten 2 mg 3-Dehydro-7 $\beta$ -acetoxy-digitoxigenin (**8**) als farbloses Material, das im DC. einheitlich war und schneller lief als 3-Dehydro-7 $\beta$ -hydroxy-digitoxigenin. Das IR.-Spektrum (fest auf NaCl) zeigte Banden bei 3590  $\text{cm}^{-1}$  (14 $\beta$ -OH); 1780  $\text{cm}^{-1}$ , 1745 und 1715  $\text{cm}^{-1}$  (C=O); 1625  $\text{cm}^{-1}$  (C=C) und 1225  $\text{cm}^{-1}$  (Acetat).

8. 1, 3, 7-Tri-O-acetyl-1 $\beta$ , 7 $\beta$ -dihydroxy-digitoxigenin (**5**) aus **4**. 25 mg 1 $\beta$ , 7 $\beta$ -Dihydroxydigitoxigenin (**5**) vom Smp. 245–250° wurden mit 0,5 ml abs. Pyridin und 0,45 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 35° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand azotrop mit Benzol bis zur Schaumbildung getrocknet. Das resultierende Rohprodukt (25 mg) wurde an 3 g Kieselgel mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{CH}_3\text{OH}$ -(99:1) als Lösungsmittel filtriert. Aus Cyclohexan-Aceton resultierten nach längerem Stehen 16 mg Kristalle vom Smp. 178–185°. Das NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$  zeigte Signale bei 0,91 und 1,065 ppm (18-Methyl und 19-Methyl); 2,01 sowie 2,05 und 2,10 ppm (Acetoxygruppen); bei 5,0 ppm (3 $\alpha$ -Protonen der Acetoxygruppen); 2,8 ppm (17 $\alpha$ -H); 5,87 und bei 5,0 ppm (Butenolidring).

9. 3, 7, 11-Tri-O-acetyl-7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-digitoxigenin (**10**) aus **9**. 30 mg 7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin (**9**) vom Smp. 267–270° wurden wie oben beschrieben acetyliert und an Kieselgel gereinigt. Es resultierten 29 mg krist. Rohprodukt. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Petroläther reines **10** vom Smp. 238–240°. Das IR.-Spektrum in Methylchlorid zeigte Banden bei 3600  $\text{cm}^{-1}$  (14 $\beta$ -OH, relativ scharf); 1785, 1750 und 1735  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, Acetyl und Butenolidring); 1630  $\text{cm}^{-1}$  (C=C, Butenolidring) und 1225  $\text{cm}^{-1}$  (Acetyl). Das NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$  zeigte Signale bei 0,97 und 1,145 ppm (18-Methyl und 19-Methyl); 1,96 sowie 2,04 und 2,10 ppm (Acetoxygruppen); bei 5,05 ppm (3 $\alpha$ -Protonen der Acetoxygruppen); 2,8 ppm (breit, 17 $\alpha$ -H); 5,86 und 4,87 ppm (Butenolidring).

10. 3, 11-Bisdehydro-7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-digitoxigenin (**13**) und 3, 7, 11-Trisdehydro-7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-digitoxigenin (**15**) aus **9**. 30 mg 7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin (**9**) vom Smp. 267–270° wurden in 50 ml Aceton unter Erwärmen gelöst. Nach Erkalten wurde das Gemisch mit 0,15 ml  $\text{CrO}_3$ -Lösung<sup>4</sup>) versetzt und 4 Min. bei 20° gerührt. Hierauf wurde mit 30 ml Wasser verdünnt, das Aceton im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung viermal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig 2N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung, Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Eindampfen resultierten aus Aceton-Äther 13 mg 3, 7, 11-Trisdehydro-7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-digitoxigenin (**13**), vom Smp. 246–249°. Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte relativ scharfe Hydroxylbanden bei 3498 und 3430  $\text{cm}^{-1}$ , C=O-Banden bei 1775, 1745 und 1690  $\text{cm}^{-1}$ , C=C bei 1627  $\text{cm}^{-1}$ . Das NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  zeigte Signale bei 0,775 und 1,155 ppm (18-Methyl und 19-Methyl); 5,86 ppm (Dublett;  $J = 5$  Hz: 7 $\beta$ -OH); 5,47 ppm (Singulett; 14 $\beta$ -OH); 6,00 und 4,96 ppm (Butenolidring).

Das aus der NMR.-Lösung zurückgewonnene Material und die Mutterlaugenrückstände von **13** wurden mit 0,1 ml  $\text{CrO}_3$ -Lösung<sup>4</sup>) in 10 ml Aceton 30 Min. bei 20° stehengelassen. Aufarbeitung wie oben ergab 17 mg Rohprodukt, das im DC. (Fließmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{CH}_3\text{OH}$ -(97:3)) neben **13** (Rf.-Wert 0,3) einen schwachen, schneller laufenden Fleck (Rf.-Wert 0,6) zeigte. Das Rohprodukt wurde an 15 g Kieselgel chromatographiert (Elutionsmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{CH}_3\text{OH}$ -(96:4); 2-ml-Fractionen).

Die Fraktionen 1–3 ergaben 2,4 mg Öl; verworfen.

Die Fraktionen 4–8 ergaben 2,8 mg DC.-einheitliches Material (Rf.-Wert 0,6). Es lieferte aus Aceton 3, 7, 11-Trisdehydro-7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-digitoxigenin (**15**) vom Smp. 211–214°. Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte Banden bei 3550  $\text{cm}^{-1}$  (OH, breit); 1775, 1740, 1705 und 1679  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) und 1628  $\text{cm}^{-1}$  (C=C, Butenolidring).

Die Fraktionen 9–15 ergaben 1,6 mg amorphes Material, das nach DC. **13** und **15** enthielt.

Die Fraktionen 16–25 (6,2 mg) ergaben aus Aceton-Äther noch krist. **13** vom Smp. 244–249°.

11. 7-O-Acetyl-3, 11-Bisdehydro-7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-digitoxigenin (**14**) aus **13**. 2 mg 3, 11-Bisdehydro-7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-digitoxigenin (**13**) vom Smp. 246–249° wurden in 0,05 ml Acetanhydrid und 0,05 ml Pyridin 24 Std. bei 35° stehengelassen. Nach Eindampfen der Lösung im

Vakuum, zuletzt unter Zusatz von Benzol und Reinigung an wenig Kieselgel, resultierten 2 mg klares Öl, das im DC. einheitlich war und schneller lief als **14**. Das IR.-Spektrum (fest auf NaCl) zeigte Banden bei 3580  $\text{cm}^{-1}$  (14 $\beta$ -OH, schwach); 1780, 1745 und 1715  $\text{cm}^{-1}$  (C=O); 1625  $\text{cm}^{-1}$  (C=C) und 1220  $\text{cm}^{-1}$  (Acetat).

12. 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Diacetoxy-14-hydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-Ätiansäure-methylester (**11**) aus **2**. In eine Lösung von 200 mg Di-O-acetyl-7 $\beta$ -hydroxy-digitoxigenin (**2**) vom Smp. 161–164° in 15 ml Essigester (mit basischem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  getrocknet) wurde während 10 Min. bei  $-70^\circ$  ein 4-proz.  $\text{O}_3/\text{O}_2$ -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  $-20^\circ$  erwärmt, worauf sie sich entfärbte. Die wieder auf  $-70^\circ$  gekühlte Lösung wurde nochmals während 5 Min. mit dem  $\text{O}_3/\text{O}_2$ -Strom behandelt (Geschwindigkeit 200 ml/Min.) und hierauf 45 Min. bei  $-70^\circ$  stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum bei möglichst tiefer Temperatur wurde das rohe Ozonid in 5 ml Eisessig gelöst und mit einem Tropfen Wasser sowie Zn-Staub in kleinen Portionen versetzt (leichte Erwärmung) und 10 Min. geschüttelt. Feuchtes KJ-Stärkepapier wurde darnach von der Reaktionslösung nicht mehr gefärbt. Nach Filtration und Nachwaschen mit Methylenchlorid wurde abgedampft, der Abdampfrückstand mit Methylenchlorid aufgenommen, mit zwei Portionen Wasser neutral gewaschen und die Lösung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das nach dem Eindampfen resultierende Produkt (205 mg) wurde in 20 ml Methanol gelöst und mit 10 ml einer kalt zubereiteten Lösung von 2,3 g  $\text{NaHCO}_3$  in 60 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt. Nach 20 Std. Rühren bei  $20^\circ$  wurde das Methanol im Vakuum entfernt und die wässrige Suspension mit Methylenchlorid-Äther (9:1) extrahiert. Die Auszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingedampft. Es resultierten 146 mg rohes Ketol **6**, das in 6 ml reinstem Methanol gelöst und mit 100 mg  $\text{H}_5\text{J}_6$  in 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt wurde. Nach 16 Std. Stehen im Dunkeln bei  $20^\circ$  wurde das Methanol im Vakuum entfernt, die Lösung dreimal mit Methylenchlorid-Äther (3:1) ausgeschüttelt, die Auszüge mit wenig Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingedampft. Es resultierten 135 mg rohe Ätiansäure, die in Äther gelöst und mit einem knappen Überschuss an frisch bereiteter ätherischer Diazomethanlösung versetzt wurde. Nach 10 Min. Stehen bei  $22^\circ$  wurde eingedampft. Das resultierende Rohprodukt (142 mg) wurde an 100 g Kieselgel mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert (Fraktionen zu 10 ml).

Die Fraktionen 15–20 ergaben 100 mg DC.-reines, amorphes Material, welches aus Petroläther-Äther kristallisierte. Nach zweimaligem Umkristallisieren wurde reiner 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Diacetoxy-5 $\beta$ ,14-hydroxy-14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-Ätiansäure-methylester (**11**) in Kristallen vom Smp. 140–141° erhalten.  $[\alpha]_D^{25} = +29^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,081$  in Methanol);  $[\alpha]_D^{25} = +13^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,151$  in Chloroform). Das IR.-Spektrum in Methylenchlorid zeigte Banden bei 3570 und 3450  $\text{cm}^{-1}$  (–OH, frei und assoz.), 1720 und 1730  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1225 und 1165  $\text{cm}^{-1}$  (– $\text{COCH}_3$ ). NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$ : 0,99 und 0,97 ppm (anguläre Methylgruppen), 2,02 ppm (zwei Acetylgruppen), 3,67 ppm (Methylester), 5,06 ppm (2 $\alpha$ -Protonen der Acetoxygruppen).

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_7$  (450,5) Ber. C 66,64 H 8,50% Gef. C 66,80 H 8,73%

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 14. Mitteilung: R. M. DODSON, G. LANGBEIN, R. D. MUIR, A. SCHUBERT, R. STIEBERT, CH. TAMM & E. WEISS-BERG, *Helv.* **48**, 1933 (1965).
- [2] Vgl. A. ČAPEK, O. HANČ & M. TADRA, «Microbial Transformations of Steroids», Academia, Prag 1966; W. CHARNEY & H. L. HERZOG, «Microbial Transformations of Steroids, a Handbook», Academic Press, New York-London 1967; H. ITZUKA & N. NAITO, «Microbial Transformation of Steroids and Alkaloids», University of Tokyo Press, Tokyo-University Park Press, State College Pennsylvania 1967.
- [3] Y. NOZAKI, *Agr. biol. Chemistry (Jap.)* **25**, 515, 879 (1961).
- [4] H. ISHII, *J. pharmaceut. Soc. (Jap.)* **81**, 153 (1961).
- [5] E. TITUS, A. W. MURRAY & H. E. SPIEGEL, *J. biol. Chemistry* **235**, 3399 (1960).
- [6] H. ISHII, Y. NOZAKI, T. OKUMURA & D. SATOH, *J. pharmaceut. Soc. (Jap.)* **80**, 1150 (1960).
- [7] G. JUHASZ & CH. TAMM, *Helv.* **41**, 1063 (1961).
- [8] Y. NOZAKI, *Agr. biol. Chemistry (Jap.)* **25**, 884 (1961); H. ISHII, Y. NOZAKI, T. OKUMURA & D. SATOH, *J. pharmaceut. Soc. (Jap.)* **81**, 805 (1961); Y. NOZAKI, E. MASUO & D. SATOH, *Agr. biol. Chemistry (Jap.)* **26**, 399 (1962).



- [9] E. WEISS-BERG & CH. TAMM, *Helv.* **46**, 2435 (1963).  
 [10] M. OKADA & HASUNUMA, *J. pharmaceut. Soc. (Jap.)* **86**, 67 (1966).  
 [11] Y. NOZAKI & K. AKAGI, 39th Meeting Agr. chem. Soc. (Jap.) Abstr. p. 100 (1964).  
 [12] A. GUBLER & CH. TAMM, *Helv.* **41**, 297 (1958); CH. TAMM & A. GUBLER, *Helv.* **42**, 239 (1959).  
 [13] H. NAWA, M. UCHIBAYASHI, T. KAMIYA, T. YAMANO, H. ARAI & M. ABE, *Nature* **184**, 469 (1959).  
 [14] M. OKADA, A. YAMADA & M. ISHIDATE, *Chem. pharmaceut. Bull.* **8**, 530 (1960); Y. NOZAKI, E. MASUO, H. ISHII, T. OKUMURA & D. SATOH, *Sympos. Chemistry Digitalis Cardiac Glycosides*, p. 114, Tokyo 1960.  
 [15] H. ISHII, Y. NOZAKI, T. OKUMURA & D. SATOH, *J. pharmaceut. Soc. (Jap.)* **81**, 1051 (1961); H. ISHII, T. OKUMURA & D. SATOH, *Chem. pharmaceut. Bull. (Jap.)*, **11**, 156 (1963).  
 [16] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* **1964**, 39.  
 [17] A. WINDAUS & G. STEIN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **61**, 2436 (1928); F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **28**, 1472 (1945).  
 [18] L. GSELL & CH. TAMM, *Helv.* **52**, (1969) im Druck.  
 [19] K. MEYER, *Helv.* **30**, 1508 (1947); S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. VON EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **37**, 1200 (1954).  
 [20] G. R. DUNCAN, *J. Chromatography* **8**, 37 (1962).  
 [21] E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1967; K. RANDEATH, «Dünnschichtchromatographie», Verlag Chemie, Weinheim 1962.

## 14. Umwandlung von Krötengiften (Bufadienoliden) durch Mikroorganismen

### IV. 7 $\beta$ -Hydroxybufalin, 7 $\beta$ -Hydroxyresibufogenin und 12 $\alpha$ -Hydroxyresibufogenin

16. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]

von L. Gsell und Ch. Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(3. XII. 68)

*Summary.* Bufalin (**1**) was transformed to 7 $\beta$ -hydroxybufalin (**2**) by an aqueous suspension of the mycelium of *Absidia orchidis* VUILL. (HAGEM.). Incubation of resibufogenin (**9**) under the same conditions yielded 12 $\alpha$ -hydroxyresibufogenin (**7**) and, under changed conditions, another monohydroxylated derivative which possesses most likely the structure of 7 $\beta$ -hydroxyresibufogenin (**10**). The corresponding cardenolide 3-O-acetyl-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (**17**) gave both the 7 $\beta$ - and the 12 $\alpha$ -monohydroxylated derivatives **18** and **22** and another monohydroxylated product **21** of unknown structure. All microbial transformation products are new.

Über das Verhalten der steroidartigen Krötengifte (Bufadienolide) gegenüber mikrobiellen Enzymsystemen ist noch sehr wenig bekannt. So ist lediglich die 12 $\beta$ -Hydroxylierung von Bufalin [2], 3-Dehydrobufalin [2], Resibufogenin [3] [2b] und Marinobufagin [4] beschrieben worden. Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Substratspezifität der Hydroxylasen von Mikroorganismen haben wir das Verhalten von Bufalin (**1**), Resibufogenin (**9**) und dem strukturell eng verwandten 3-O-Acetyl-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (**17**) gegenüber Kulturen von *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM. studiert. Von diesem Mikroorganismus ist bekannt, dass er REICHSTEIN's Subst. S (Cortexolon) in den 1 $\beta$ -, 6 $\beta$ -, 11 $\alpha$ - und 11 $\beta$ -Stellungen zu hydroxylieren vermag [5]. Bei Progesteron werden durch *A. orchidis* die 6 $\beta$ -, 7 $\alpha$ - und 11 $\alpha$ -