

- [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)

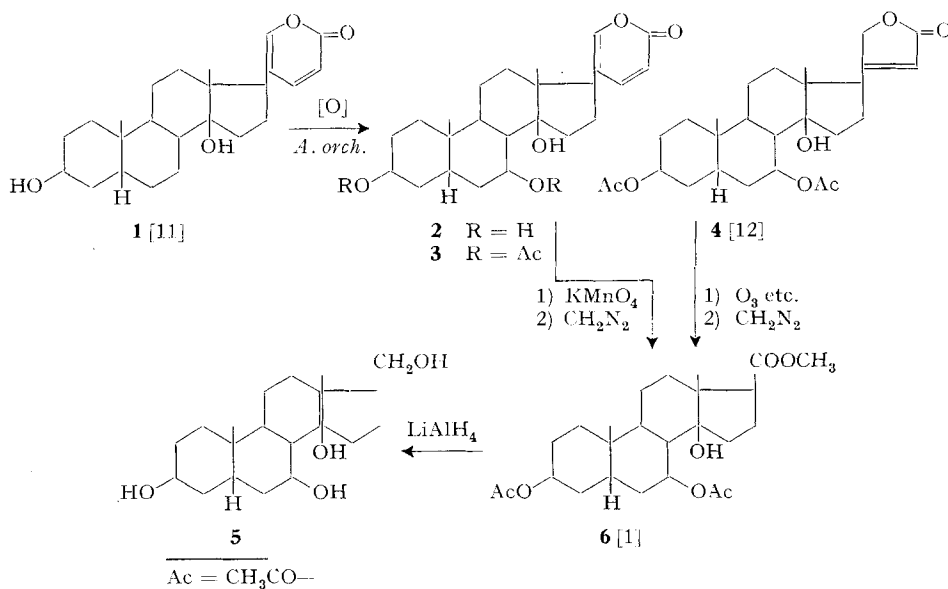
*Summary.* Bufalin (**1**) was transformed to 7 $\beta$ -hydroxybufalin (**2**) by an aqueous suspension of the mycelium of *Absidia orchidis* VUILL. (HAGEM.). Incubation of resibufogenin (**9**) under the same conditions yielded 12 $\alpha$ -hydroxyresibufogenin (**7**) and, under changed conditions, 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 $\alpha$ -

Stellungen hydroxyliert [6]. Bei  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion ist noch zusätzlich eine  $14\alpha$ -Hydroxylierung beobachtet worden [7]. Die Umsetzung des Cardenolids Digitoxigenin führte zu Acovenosigenin A ( $1\beta$ -Hydroxylierung), Periplogenin ( $5\beta$ -Hydroxylierung),  $7\beta$ -Hydroxydigitoxigenin sowie zu  $1\beta,5\beta$ - und  $1\beta,7\beta$ -Dihydroxydigitoxigenin [8]. In 4,5-Dehydrodigitoxigenon und  $3\beta,14,21$ -Trihydroxy- $14\beta$ -pregnan-20-on finden die Hydroxylierungen ebenfalls in den  $1\beta$ -,  $7\beta$ - und  $12\beta$ -Stellungen statt [9].

Unsere eigenen Versuche, über die im folgenden berichtet wird, führten wir, in Anlehnung an die Methodik von NOZAKI<sup>1)</sup>, mit wässrigen Mycelsuspensionen von *Absidia orchidis* in Schüttelkulturen unter aeroben Bedingungen bei 25–27° durch, wobei eine Aktivierung der Hydroxylasen durch Vorinkubation mit Progesteron vorgenommen wurde<sup>2)</sup>.

Bufalin (**1**)<sup>3)</sup> ergab nach einer Inkubationszeit von 16 Std. in ca. 65-proz. Ausbeute ein krist. Reaktionsprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm einheitlich war und langsamer als **1** lief. Das Dünnschichtchromatogramm des Rohproduktes hatte mindestens vier weitere, allerdings bedeutend schwächere Flecke erkennen lassen. Es



wurde aber nicht versucht, diese Nebenprodukte zu isolieren, da sie sich nur in Spuren gebildet hatten. Das Hauptprodukt vom Smp. 253–256° enthält nach den IR.- und NMR.-Spektren den intakt gebliebenen Pentadienolidring. Die Analysenwerte deuten auf die Formel  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$  eines Monohydroxyderivates von **1** hin. Auf Grund der Abbaureaktion (siehe unten) kommt ihm die Struktur des noch unbekanntes  $7\beta$ -Hydroxybufalins (**2**) zu. Bei der Behandlung mit Acetanhydrid in Pyridin bei 37° wurde

1) Wir danken Herrn Dr. Y. NOZAKI, SHIONOGI & CO. LTD., Osaka, Japan, für die Überlassung einer Kultur von *Absidia orchidis* und die Angaben über experimentelle Einzelheiten.

2) Die Hydroxylierungen verlaufen unter diesen Bedingungen wesentlich selektiver. Bei Digitoxigenin wird dadurch die  $1\beta$ -Hydroxylierung zu Gunsten der  $5\beta$ - und  $7\beta$ -Hydroxylierung zurückgedrängt [10].

das Di-O-acetylderivat **3** ( $C_{28}H_{38}O_7$ ) erhalten, das im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 1) keine starken HO-Schwingungen mehr, dafür im NMR.-Spektrum zwei 3-Protonen-Signale erkennen liess, die den Acetylgruppen zuzuordnen sind. Um die Stellung der eingeführten Hydroxylgruppe abzuklären, wurde das Di-O-acetylderivat **3** mit  $KMnO_4$  in Aceton abgebaut. Die sauren Anteile der Oxydationsprodukte lieferten, nach Behandlung mit Diazomethan in Äther, einen krist. Ätiansäure-methylester, der sich in allen Eigenschaften als identisch mit dem  $3\beta,7\beta$ -Diacetoxy- $14\beta$ -hydroxy- $5\beta,14\beta,17\alpha$ H-ätiansäure-methylester (**6**) [1] erwies. **6** ist durch Abbau von Di-O-acetyl- $7\beta$ -hydroxy-digitoxigenin (**4**) mit  $O_3$  usw. kürzlich erhalten worden [1]. Durch Reduktion mit  $LiAlH_4$  in Tetrahydrofuran unter Rückfluss während 2 Std. liess sich der Abbau-ester **6** in das krist. Tetrol **5** überführen.

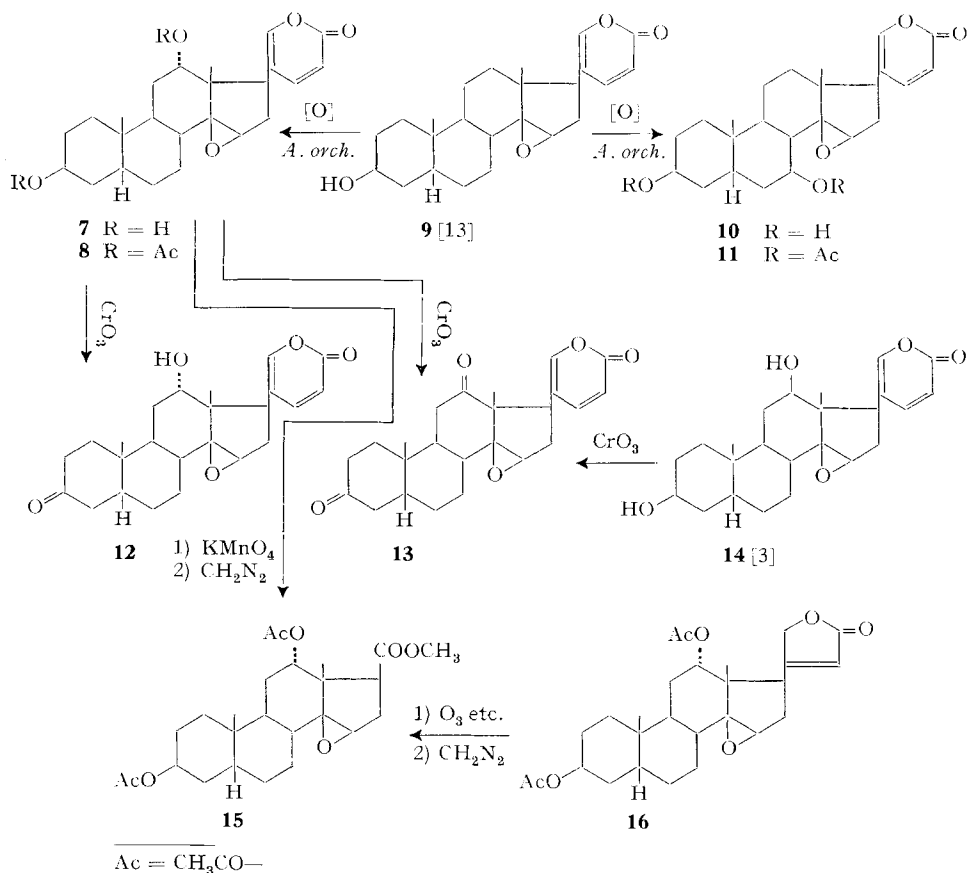
Resibufogenin (**9**)<sup>3</sup>) unterscheidet sich von Bufalin (**1**) nur dadurch, dass an Stelle der  $14\beta$ -Hydroxygruppe ein  $14\beta,15\beta$ -Oxiranring getreten ist. Es war daher auch bei diesem Substrat eine  $7\beta$ -Hydroxylierung durch *Absidia orchidis* zu erwarten. Nach einer Inkubationszeit von 18 Std. konnte in ca. 33-proz. Ausbeute ein krist. Reaktionsprodukt gewonnen werden, das im Dünnschichtchromatogramm einheitlich war und langsamer als **9** lief (Fleck A). Neben wenig Ausgangsmaterial waren auf dem Dünnschichtchromatogramm noch drei weitere noch langsamer wandernde Nebenprodukte (Flecke B, C und D) zu erkennen. Die im Vergleich zu Bufalin schlechtere Ausbeute an Hauptprodukt könnte auf den labilen Charakter des Epoxids zurückzuführen sein, der die Bildung von Nebenprodukten sowohl während der Inkubation wie auch bei der anschliessenden chromatographischen Trennung verursachen könnte. Ein Versuch, bei welchem Resibufogenin (**9**) portionsweise in Abständen von 2 Std. zum Pilzmycel gegeben wurde, hat andererseits gezeigt, dass die Hydroxylierung nicht spezifisch nur an einem C-Atom erfolgt, sondern in vermehrter Masse Nebenprodukte liefert.

Das Hauptprodukt vom Smp.  $152-155^\circ$  (Fleck A) enthielt nach den IR.- und NMR.-Spektren sowohl den intakt gebliebenen Pentadienolidring wie den Oxiranring. Die C,H-Bestimmung deutete, unter Berücksichtigung von einer Molekel Kristallwasser, auf die Formel  $C_{24}H_{32}O_5$  eines Monohydroxyderivates hin<sup>4</sup>). Auf Grund der weiteren, im folgenden beschriebenen Reaktionen handelt es sich bei diesem Umsetzungsprodukt überraschenderweise um das noch unbekanntes  $12\alpha$ -Hydroxyresibufogenin (**7**). Seine Struktur wurde wie folgt bewiesen: Mit Acetanhydrid-Pyridin lieferte **7** das Di-O-acetylderivat **8**, dessen IR.- und NMR.-Spektren (vgl. Fig. 2 und 3) wiederum die für den  $14\beta,15\beta$ -Oxiranring, den Pentadienolidring und die zwei Acetylgruppen typischen Merkmale aufwies.

Die Oxydation von **7** mit  $CrO_3-H_2SO_4$  in Aceton (Methodik nach [14]) ergab ein krist. Diketon, das nach allen üblichen Kriterien identisch mit dem durch Oxydation des bekannten  $12\beta$ -Hydroxyresibufogenins (**14**) [3] erhaltenen Diketon **13** war. Damit ist die Konstitution des Hauptproduktes der mikrobiologischen Umsetzung von Resi-

<sup>3</sup>) Für die grosszügige Überlassung von Bufalin und Resibufogenin sei Herrn Prof. Dr. K. MEYER, Basel, auch an dieser Stelle bestens gedankt.

<sup>4</sup>) Da die Substanz stark hygroskopisch ist, lieferten die C,H-Bestimmungen keine befriedigenden Werte. Die Analysenresultate des Di-O-acetylderivates und aller weiteren Reaktionsprodukte stimmten jedoch mit der postulierten Formel sehr gut überein. Auch Resibufogenin (**9**) [13] und  $12\beta$ -Hydroxyresibufogenin [3] kristallisieren bevorzugt mit Kristallwasser.



bufogenin gesichert. Neben dem Diketon **13** wurde durch Chromatographie in geringer Ausbeute ein kristallines Nebenprodukt isoliert, das im Dünnschichtchromatogramm langsamer als das Ausgangsprodukt lief, aber im IR.-Spektrum noch eine HO-Bande zeigte. Es dürfte sich um das 3-Dehydro-12 $\alpha$ -hydroxy-resibufogenin (**12**) handeln.

Zur weiteren Erhärtung der Struktur von **7** bauten wir sein Di-O-acetylderivat **8** oxydativ mit  $\text{KMnO}_4$  in Aceton ab. Nach Veresterung der sauren Anteile des Oxydationsgemisches mit Diazomethan wurde als Hauptprodukt der amorphe 3 $\beta$ ,12 $\alpha$ -Di-acetoxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-methylester (**15**) erhalten. Das Präparat war in allen physikalischen Eigenschaften identisch mit dem Methylester, der durch Abbau von Di-O-acetyl-12 $\alpha$ -hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digoxigenin (**16**) (s. unten) mit Ozon usw. bereitet worden war. Der Versuch, den Epoxyester **15** mit  $\text{LiAlH}_4$  zu reduzieren, scheiterte, indem die Reaktion sehr uneinheitlich verlief und keines der zahlreichen Produkte fassbar war.

Im Einklang mit der chemisch bewiesenen 12 $\alpha$ -Hydroxygruppe ist auch die Lage der NMR.-Signale der 18- und 19-Methylgruppen in Di-O-acetyl-12 $\alpha$ -hydroxy-resibufogenin (**8**), dem Abbauester **15** und dem weiter unten beschriebenen Di-O-acetyl-12 $\alpha$ -hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digoxigenin (**16**) (vgl. Tabelle). Der für

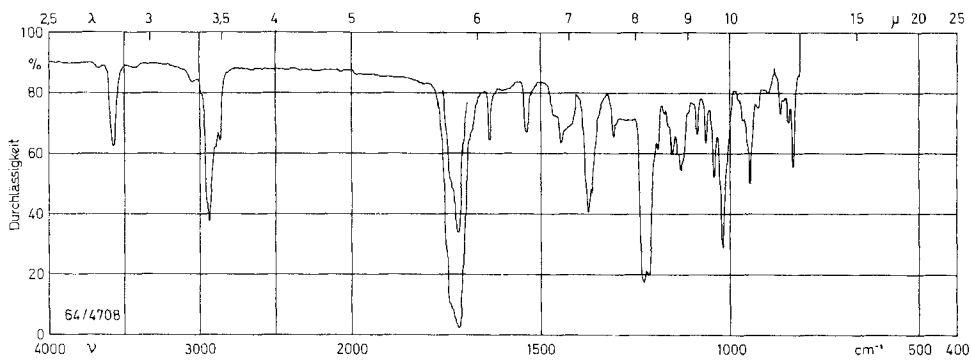


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von 3,7-Di-O-acetyl-7 $\beta$ -hydroxy-bufalin (**3**), in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2^5$

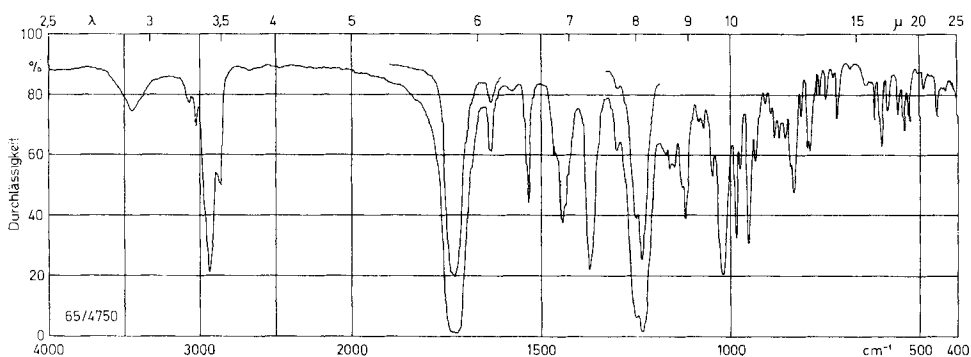


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von 3,12-Di-O-acetyl-12 $\alpha$ -hydroxy-resibufogenin (**8**), fest in  $\text{KBr}^5$

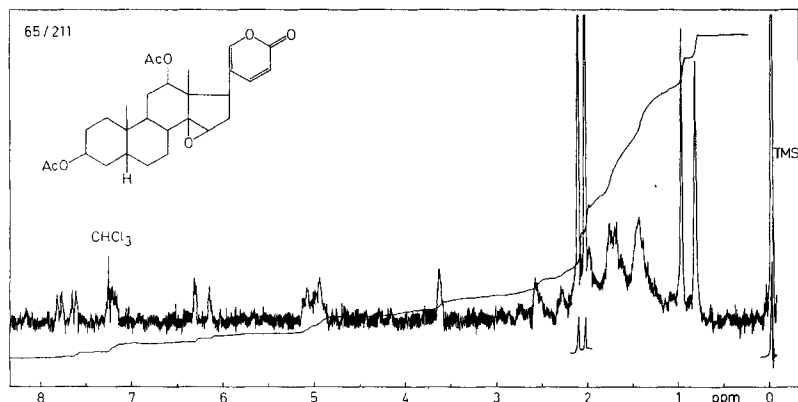


Fig. 3. NMR.-Spektrum von 3,12-Di-O-acetyl-12 $\alpha$ -hydroxy-resibufogenin (**8**) in  $\text{CDCl}_3^6$

- <sup>5</sup>) Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, im Spektrollaboratorium unseres Instituts (K. AEGERTER und W. SCHWAB).
- <sup>6</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.

eine  $12\alpha$ -Acetoxygruppe berechnete Beitrag der chemischen Verschiebung auf diese angulären Methylgruppen stimmt, wie die Tabelle zeigt, sehr gut auf die für die drei Verbindungen **8**, **16** und **15** berechneten Werte<sup>7)</sup>.

Von den drei im Dünnschichtchromatogramm erkennbaren Nebenprodukten (Flecke B, C und D) konnte das dem Fleck B entsprechende in reiner krist. Form gewonnen werden. Auch nach Acetylierung und erneuter Säulenchromatographie gelang es nicht, die zwei weiteren Nebenprodukte rein zu erhalten. Dem krist. Nebenprodukt vom Smp. 248–258° kommt vermutlich die Struktur des  $7\beta$ -Hydroxyresibufogenins (**10**) zu. Das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 4) zeigte neben einer starken HO-Bande die Banden des intakten Pentadienolidringes. Mit Acetanhydrid-Pyridin wurde ein Di-O-acetylderivat erhalten, dessen NMR.-Spektrum neben dem Epoxidring zwei Acetylgruppen erkennen liess. Die chemischen Verschiebungen der 18- und 19-Methylgruppen im NMR.-Spektrum bei 0,80 und 1,04 ppm sind am besten mit den berechneten Werten (0,823 und 1,045 ppm) des Di-O-acetyl- $7\beta$ -hydroxy-resibufogenins (**11**) zu vereinbaren<sup>7)</sup>. Für den Abbau von **12** zum  $3\beta, 7\beta$ -Diacetoxy- $14\beta, 15\beta$ -epoxy- $5\beta, 14\beta$ -ätiansäure-methylester (**23**) und die Verknüpfung mit dem analogen Cardenolid **18** reichte die vorhandene Menge nicht. Die Konstitution von  $7\beta$ -Hydroxyresibufogenin (**10**) ist infolgedessen nicht völlig bewiesen, jedoch sehr wahrscheinlich.

Für die Durchführung der obigen Strukturbeweise benötigten wir das noch unbekannte  $7\beta$ -Hydroxy- $14\beta, 15\beta$ -epoxy- $14$ -anhydro-digitoxigenin (**18**) als Ausgangsmaterial. Um es zu erhalten, setzten wir 3-O-Acetyl- $14\beta, 15\beta$ -epoxy- $14$ -anhydro-digitoxigenin (**17**), das aus Digitoxigenin leicht zugänglich ist [3] [16], mit einer wässrigen Mycelsuspension von *Absidia orchidis* um. Nach einer Inkubationszeit von 8–11 Stunden erschienen im Dünnschichtchromatogramm ein Hauptfleck (Fleck A) und 3 weitere polarere Nebenflecke (Flecke B, C und D). Nach Chromatographie an Kieselgel konnte das Hauptprodukt vom Smp. 253–255° in ca. 45-proz. Ausbeute erhalten werden. Die Signale der IR.- und NMR.-Spektren (vgl. Fig. 5 und 6) zeigten den in-

*Bestimmung des Verschiebungsbeitrags der  $12\alpha$ -Acetoxygruppe auf die angulären Methylgruppen in  $CDCl_3$  (in ppm)<sup>7)</sup>*

Verbindung	Di-O-acetyl- $12\alpha$ -hydroxy-resibufogenin ( <b>8</b> )		Di-O-acetyl- $12\alpha$ -hydroxy- $14\beta, 15\beta$ -epoxy- $14$ -anhydro-digitoxigenin ( <b>16</b> )	
	C-18	C-19	C-18	C-19
$5\beta, 14\alpha$ -Androstan	0,692	0,925	0,692	0,925
$3\beta$ -OAc	0,008	0,058	0,008	0,058
$14\beta, 15\beta$ -Epoxy- $17\beta$ - $C_4H_3O_2$ <sup>a)</sup>	–	–	0,24	0,03
$14\beta, 15\beta$ -Epoxy- $17\beta$ - $C_5H_3O_2$ <sup>b)</sup>	0,080	0,020	–	–
Summe	0,780	1,003	0,940	1,013
Gefunden	0,835	0,985	1,005	1,005
Berechnet für $12\alpha$ -Acetoxy	+ 0,055	– 0,018	+ 0,06(5)	– 0,00(8)

<sup>a)</sup>  $C_4H_3O_2$  = Butenolidring

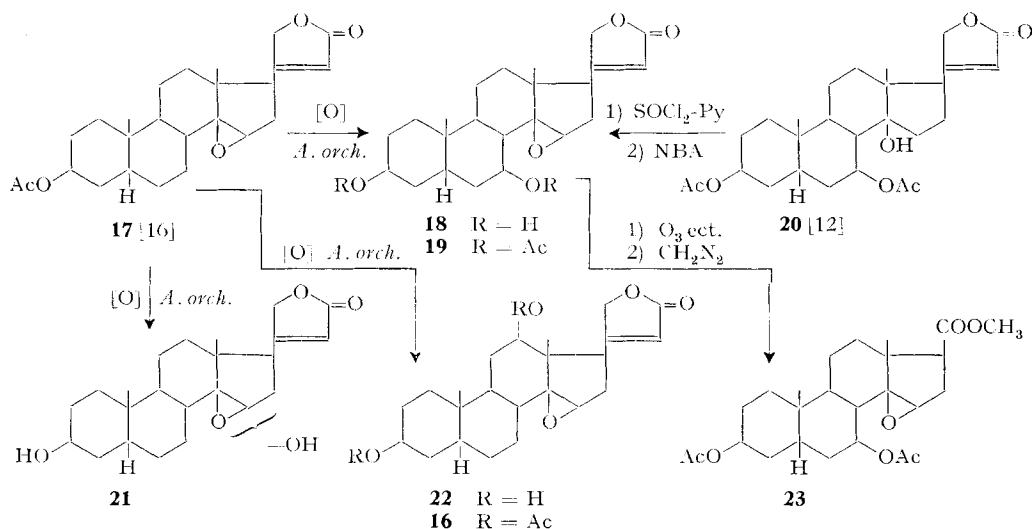
<sup>b)</sup>  $C_5H_3O_2$  = Pentadienolidring

<sup>7)</sup> Für Einzelheiten vgl. GSELL & TAMM [15].

takt gebliebenen Oxiran- sowie den Butenolidring an. Die Verbindung besitzt die Struktur des erwünschten 7 $\beta$ -Hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenins (**18**). Diese Struktur wurde wie folgt bewiesen: Mit Acetanhydrid-Pyridin lieferte **18** das Di-O-acetylderivat **19**, dessen IR.- und NMR.-Spektren wieder die für den Oxiranring, den ungesättigten Lactonring sowie die Acetylgruppen typischen Banden bzw. Signale aufwiesen.

Zur weiteren Verknüpfung wurde 3,7-Di-O-acetyl-7 $\beta$ -hydroxy-digitoxigenin (**20**), dessen Struktur gesichert ist, mit SOCl<sub>2</sub> in Pyridin bei –15° behandelt und das gebildete 14-Anhydroderivat sofort mit N-Bromacetamid in Aceton-Wasser [16] umgesetzt. Das resultierende Produkt war mit dem auf mikrobiologischem Wege erhaltenen Präparat **19** in allen Eigenschaften identisch. Damit ist die 7 $\beta$ -Hydroxygruppe von **18** bewiesen. Im Hinblick auf die chemische Verknüpfung mit weiteren mikrobiellen Umwandlungsprodukten wurde das Diacetat **19** noch mit Ozon abgebaut. Aus den sauren Anteilen wurde, nach Methylierung mit Diazomethan, der 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Diacetoxyl-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-methylester (**23**) erhalten.

Von den drei Nebenprodukten, welche nach der Umsetzung von **17** mit *A. orchidis* im Dünnschichtchromatogramm (Flecke B, C und D) festgestellt wurden, konnte eines durch Chromatographie an Kieselgel abgetrennt werden. Es verhielt sich im Dünnschichtchromatogramm einheitlich, bestand aber nach dem NMR.-Spektrum aus einem Gemisch von zwei Substanzen im Verhältnis von ca. 1:1 (Gemisch B). Nach Acetylierung des Gemisches mit Acetanhydrid-Pyridin und nochmaliger Chromatographie an Kieselgel konnte eines der beiden Acetylderivate in reiner krist. Form abgetrennt werden. Es handelt sich um das Di-O-acetyl-12 $\alpha$ -hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (**16**). Die Konstitution dieser Verbindung wurde wiederum mit Hilfe des Ozonabbaus und anschließender Veresterung der sauren Anteile mit Diazomethan bewiesen. Der resultierende Methylester war nach dem IR.-Spektrum identisch mit dem durch oxydativen Abbau von 3,12-Di-O-acetyl-12 $\alpha$ -hydroxy-



Ac = CH<sub>3</sub>CO ; NBA = N-Bromacetamid ; Py = Pyridin

resibufogenin (**8**) erhaltenen  $3\beta, 12\alpha$ -Diacetoxy- $14\beta, 15\beta$ -epoxy- $5\beta, 14\beta, 17\alpha$ H-ätiansäure-methylester **15**.

Die zweite Komponente des Gemisches B konnte weder als solche noch als Acetyl-derivat rein erhalten werden. Hingegen kristallisierten in geringen Mengen zwei weitere

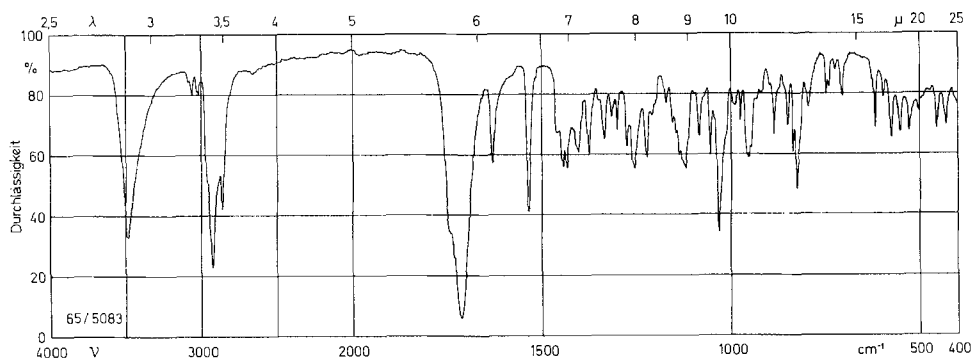


Fig. 4. IR.-Absorptionsspektrum von  $7\beta$ -Hydroxyresibufogenin (**10**), fest in  $KBr^5$ )

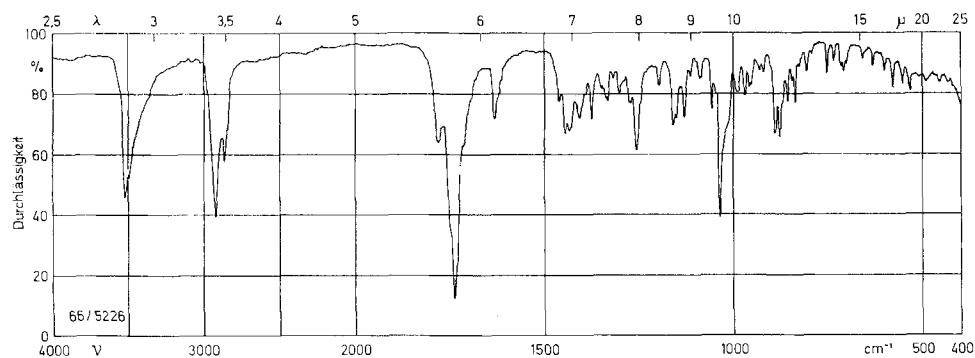


Fig. 5. IR.-Absorptionsspektrum von  $7\beta$ -Hydroxy- $14\beta, 15\beta$ -epoxy- $14$ -anhydro-digitoxigenin (**18**), fest in  $KBr^5$ )

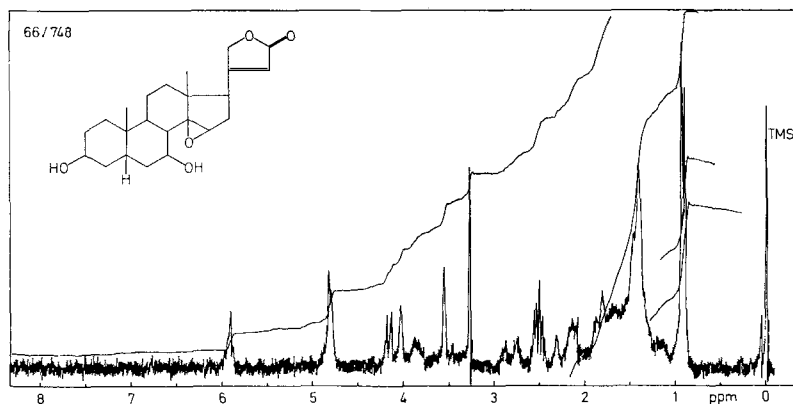


Fig. 6. NMR.-Spektrum von  $7\beta$ -Hydroxy- $14\beta, 15\beta$ -epoxy- $14$ -anhydro-digitoxigenin (**18**) in  $(CD_3)_2SO^6$ )



Nebenprodukte, welche aber nicht den ursprünglichen Nebenflecken B, C oder D im Dünnschichtchromatogramm entsprachen. Beim einen dürfte nach den IR.- und UV.-Spektren ein Derivat des Progesterons vorliegen. Progesteron war als Aktivator dem Pilzmycel zugegeben worden. Beim anderen vom Smp. 253–255° handelt es sich, nach dem Verhalten bei der Chromatographie und im Dünnschichtchromatogramm, vermutlich um ein weiteres Monohydroxyderivat **21** von 14 $\beta$ ,15 $\beta$ -Epoxy-14-anhydrodigitoxigenin. Seine Konstitution konnte noch nicht aufgeklärt werden.

*Diskussion der Ergebnisse.* Die Hydroxylierung von Bufalin durch eine wässrige Mycelsuspension von *Absidia orchidis* verläuft gleich wie bei Digitoxigenin. In beiden Fällen tritt die Hydroxylgruppe in die 7 $\beta$ -Stellung ein, d. h. im Gegensatz zu der bei den  $\Delta^4$ -3-Ketonen der Androstan- und Pregnanreihe beobachteten Hydroxylierung in den 1 $\beta$ -, 6 $\beta$ -, 7 $\alpha$ -, 11 $\alpha$ -, 11 $\beta$ - und 14 $\alpha$ -Stellungen herrscht bei den Cardenoliden und Bufadienoliden mit 14 $\beta$ -ständiger HO-Gruppe die 7 $\beta$ -Hydroxylierung vor. Demzufolge bewirkt der Ersatz des 17 $\beta$ -Butenolidrings durch den 17 $\beta$ -Hexadienolidring keine Änderung der Reaktivität. Hingegen wird Resibufogenin (**9**) unter den gleichen Bedingungen in der 12 $\alpha$ -Stellung hydroxyliert. Erst wenn das Substrat in kleineren Dosen zur Mycelsuspension gegeben wird, bildet sich auch etwas 7 $\beta$ -Hydroxyresibufogenin. Das bestätigt die Beobachtung, dass höhere Substratkonzentrationen die 7 $\beta$ -Hydroxylierung hemmen [8]. Auch bei den Cardenoliden bewirkt die Einführung eines 14 $\beta$ ,15 $\beta$ -Oxiranrings, wenn auch in geringem Masse, eine Bevorzugung der 12 $\alpha$ -Hydroxylierung gegenüber der 7 $\beta$ -Hydroxylierung. 12 $\alpha$ -Hydroxylierungen sind in der Cardenolid- und Bufadienolidreihe bisher nicht beobachtet worden. Zum Schluss sei noch erwähnt, dass weder Scillarenon (3-Oxo- $\Delta^4$ -Bufalin) noch Bufotalin (16 $\beta$ -Acetoxylbufalin) durch *A. orchidis* umgesetzt wurden. Auch nach längerer Inkubationszeit und bei Zugabe von KCN [4] war kaum eine Umsetzung zu beobachten. Ebenso wenig liessen sich Sarmentogenin (11 $\alpha$ -Hydroxydigitoxigenin) und Digoxigenin (12 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin) durch *A. orchidis* umwandeln.

Es ist kaum ein Schimmelpilz bekannt, der wie *Absidia orchidis* das Steroidgerüst an so verschiedenen C-Atomen zu hydroxylieren vermag. Daher ist es auf Grund der vorliegenden Resultate schwierig, Aussagen über die Stereospezifität des betreffenden Enzymsystems zu machen.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG (Projekte 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 Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (E. THOMMEN). Die IR.-Spektren wurden entweder mit dem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrometer, Modell 125, oder mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell IR-8, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A-60, im Spektrallaboratorium 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 [17] und Silicagel (Korngrösse 0,15–0,33 mm). Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) nach STAHL (vgl. [18]) wurde Kieselgel G als Adsorbens verwendet. Die Flecke wurden durch Besprühen mit 20proz. SbCl<sub>3</sub>-Lösung in Chloroform [19] oder durch J<sub>2</sub>-Dämpfe sichtbar gemacht.

2. *Kultur der Mikroorganismen.* Proben einer Schrägagarkultur von *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM. (Herkunft Dr. Y. NOZAKI, SHIONOGI & CO., LTD., Osaka, Japan) wurden direkt als Impfmaterial für die Nährlösung verwendet. Nährlösung: 3,5% Glucose, 3% Bacto-Pepton, 0,5% Maislauge. Zum Versuch wurden 1000-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 100–200 ml Nährlösung benutzt. Die Gefässe wurden 30 Min. bei 120° im Dampfautoklaven sterilisiert und dann beimpft. Die ERLENMEYER-Kolben wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) bei 27° 48 Std. inkubiert, worauf je ERLENMEYER-Kolben 30 mg Progesteron in 0,5 ml Aceton zugegeben wurde. Nach weiteren 16 Std. Schütteln wurde das Mycel durch Filtration auf einem Gazestoff gesammelt, leicht ausgepresst und mit dest. Wasser gewaschen und wiederum auf die ERLENMEYER-Kolben mit je 100–200 ml dest. Wasser verteilt. Zu dieser Mycelsuspension wurde das Substrat, gelöst in wenig Methanol oder Aceton, gegeben.

3. *Umsetzung von Bufalin (1) mit Absidia orchidis.* Eine Lösung von 400 mg Bufalin (1) vom Smp. 240–243° in 20 ml Methanol wurde auf 16 1000-ml-ERLENMEYER-Kolben verteilt, in welchen das Pilzmycel in je 100 ml Wasser suspendiert war. Die Kolben wurden 16 Std. bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Mycels und Nachwaschen mit Methylchlorid-Methanol-(9:1) wurde die wässrige Lösung viermal mit Methylchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Die Auszüge ergaben nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 412 mg Rohprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel Äther) einen starken Fleck von 7β-Hydroxybufalin (2) (Rf-Wert 0,44), einen schwachen Fleck von Bufalin (1) (Rf-Wert 0,55) sowie 4 weitere sehr schwache Flecke (Rf-Werte < 0,4) zeigte. Das Rohprodukt wurde an 40 g Silicagel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 50 ml Lösungsmittel pro Fraktion (Benzol mit steigenden Mengen Methanol).

Die Fraktionen 1–6 (eluert mit Benzol) ergaben 24 mg gelbes Öl; verworfen.

Die Fraktionen 7–16 (eluert mit Benzol-Methanol-(99:1 bis 98:2)) ergaben 3 mg amorphes Material.

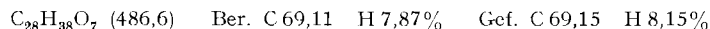
Die Fraktionen 17–24 (eluert mit Benzol-Methanol-(98:2 bis 94:6)) ergaben 58 mg amorphes Material. Nach DC.: Gemisch von Edukt 1 und wenig 7β-Hydroxybufalin (2).

Die Fraktionen 25–31 (eluert mit Benzol-Methanol-(94:6 bis 90:10)) ergaben 260 mg Rohprodukt (im DC. einheitlich), das aus Methanol-Aceton 155 mg Prismen vom Smp. 245–251° lieferte. Nach Umkristallisieren aus Methylchlorid-Äther resultierte reines 7β-Hydroxybufalin (2) vom Smp. 253–256° [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>24</sup> = –7,5 ± 2° (c = 0,537 in Methanol). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte Banden bei 3380 cm<sup>-1</sup> (breit, –OH), um 1700 cm<sup>-1</sup> (relativ breit, C=O, Pentadienolidring), 1630 und 1535 cm<sup>-1</sup> (C=C, Pentadienolidring). Das NMR.-Spektrum (in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) zeigte Signale bei: 0,63 und 0,89 ppm (18- und 19-Methyl), 5,55 ppm (–OH), und 7,99 7,55 und 6,29 ppm (Protonen des Pentadienolidrings mit charakteristischer Kopplung)<sup>7</sup>.



Die Fraktionen 33–37 (eluert mit Benzol-Methanol-(90:10 bis 60:40)) ergaben 55 mg amorphes Material, das nicht weiter untersucht wurde.

4. *Di-O-acetyl-7β-hydroxy-bufalin (3) aus 2.* 148 mg 7β-Hydroxybufalin (2) vom Smp. 245 bis 251° wurden mit 1,2 ml abs. Pyridin und 1,05 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 40° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum – zuletzt nach Zugabe von Benzol – resultierten 165 mg Rohprodukt, das an 5 g Silicagel mit Methylchlorid-Methanol-(98:2) gereinigt wurde. Aus Methanol wurden 154 mg Kristalle vom Smp. 200–206° erhalten. Nach Umkristallisieren aus Methanol-Aceton resultierte reines 3 vom Smp. 204–206°. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = –23° ± 2° (c = 1,097 in Methanol). Im IR.-Spektrum (in Methylchlorid) (Fig. 1) Banden bei 1720 cm<sup>-1</sup> (C=O, Acetyl und Pentadienolid); 1635 cm<sup>-1</sup> (C=C, Pentadienolid) und 1230 cm<sup>-1</sup> (–OCOCH<sub>3</sub>). Das NMR.-Spektrum in CDCl<sub>3</sub> zeigte Signale bei 0,75 und 1,03 ppm (18- und 19-Methyl); 2,11 und 2,01 ppm (Acetylgruppen); 5,06 ppm (2 H geminal zu den Acetoxygruppen) und die Protonen des Pentadienolidrings bei 7,73 ppm (Quartett mit J = 10 bzw. 2,5 Hz), 7,22 ppm (verbreitertes Dublett mit J = 2,5 Hz) und 6,25 ppm (Dublett mit J = 10 Hz).



5. *KMnO<sub>4</sub>-Abbau von 3,7-Di-O-acetyl-7β-hydroxy-bufalin (3): 3β,7β-Diacetoxy-14β-hydroxy-5β,14β,17αH-ätiansäure-methylester (6).* Eine Lösung von 100 mg 3 in 3 ml Aceton (frisch über KMnO<sub>4</sub> destilliert) wurde unter Rühren während 4 Std. portionsweise mit insgesamt 220 mg fein gepulvertem KMnO<sub>4</sub> versetzt (zu Beginn 125 mg, nach 30 Min. 50 mg, nach 2 Std. 45 mg KMnO<sub>4</sub>).

Das braun gefärbte Gemisch wurde abgedampft, der Rückstand in 40 ml H<sub>2</sub>O suspendiert und die Suspension mit 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 1 gebracht. Hierauf wurde durch Einleiten von SO<sub>2</sub> unter Kühlung entfärbt und mit Chloroform-Äther-(4:1) ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser und Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> resultierten 101 mg Rohprodukt, das in 100 ml Äther gelöst und mit frisch zubereiteter ätherischer Diazomethanlösung versetzt wurde. Nach Stehen während 15 Min. wurde eingedampft und der Eindampfrückstand (98 mg) an 30 g Silicagel mit Äther-Petroläther-(7:3) als Elutionsmittel chromatographiert (10 ml pro Fraktion).

Die Fraktionen 9–11 ergaben nach Umkristallisieren aus Petroläther-Äther 29 mg reinen Ester **6** vom Smp. 137–140°.  $[\alpha]_D^{25} = +27^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,086$  in Methanol). Das IR.-Spektrum in Methylchlorid zeigte Banden bei 3570 cm<sup>-1</sup> und 3450 cm<sup>-1</sup> (–OH, frei bzw. assoziiert), 1730 und 1720 cm<sup>-1</sup> (C=O, Acetyl und Pentadienolidring) sowie 1225 cm<sup>-1</sup> (–OCOCH<sub>3</sub>). Nach Smp., Misch-Smp. und IR.-Spektrum ist das Präparat mit dem aus **4** gewonnenen Abbauester identisch.

6. *3β,7β,14,20-Tetrahydroxy-5β,14β-21-nor-pregnan (5) aus 6*. Eine Lösung von 49 mg Abbauester **6** vom Smp. 137–140° in 7 ml Tetrahydrofuran (frisch durch basisches Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filtriert) wurde unter Rühren mit 100 mg LiAlH<sub>4</sub> versetzt und 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlung der Lösung wurde mit Eis zerlegt, mit 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 1 gebracht und die Lösung fünfmal mit Äther ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser, Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen im Vakuum resultierten 35 mg Rohprodukt, das aus Aceton 21 mg Rohkristallinat lieferte. Nach Umkristallisieren aus Aceton reines **5** in Prismen vom Smp. 221–224°.  $[\alpha]_D^{25} = +9^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,582$  in Methanol). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte eine breite Hydroxylbande bei 3250 cm<sup>-1</sup>, hingegen im Bereich der C=O-Schwingungen keinerlei Signale.



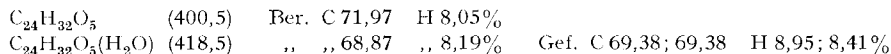
7. *Umsetzung von Resibufogenin (9) mit Absidia orchidis*. – a) Eine Lösung von 500 mg **9** vom Smp. 90 → 160–170° in 15 ml Methanol wurde auf 25 1000-ml-ERLENMEYER-Kolben verteilt, in welchen das Pilzmycel in je 100 ml Wasser suspendiert war. Die Kolben wurden 18 Std. bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Mycels und Nachwaschen mit Methylchlorid-Methanol-(9:1) wurde die wässrige Lösung viermal mit Methylchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Die Auszüge ergaben nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 527 mg Rohprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Methylchlorid-Methanol-(93:7)) einen starken Fleck (A) von 12α-Hydroxyresibufogenin (**7**) (Rf-Wert 0,4), einen schwachen Fleck von Resibufogenin (**9**) (Rf-Wert 0,5) sowie drei weitere polare Nebenflecke (B, C und D) zeigte. Das Rohprodukt wurde an 100 g Kieselgel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 100 ml Lösungsmittel pro Fraktion (Benzol mit steigenden Mengen Methanol).

Die Fraktionen 1–6 (eluiert mit Benzol-Methanol-(100:0 bis 94:6)) ergaben 21 mg gelbes Öl; verworfen.

Die Fraktionen 7–10 (eluiert mit Benzol-Methanol-(96:4)) ergaben 69 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 11–14 (eluiert mit Benzol-Methanol-(96:4)) ergaben 79 mg amorphes Material, das auch Edukt enthielt.

Die Fraktionen 15–19 (eluiert mit Benzol-Methanol-(96:4)) ergaben 165 mg im DC. einheitliches Rohprodukt, das aus Nitromethan-Aceton-(1:1) 120 mg Kristalle vom Smp. 149–160° lieferte. Nach Umkristallisieren aus Methanol reines *12α-Hydroxyresibufogenin (3β,12α-Dihydroxy-14β,15β-epoxy-5β-A<sup>20</sup>,22-bufadienolid) (7)* vom Smp. 152–153°.  $[\alpha]_D^{25} = +37^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,895$  in Methanol). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte Banden bei 1745 und 1705 cm<sup>-1</sup> (C=O, Pentadienolidring) und 1535 cm<sup>-1</sup> (C=C, Pentadienolidring). Das NMR.-Spektrum (in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) zeigte Signale bei 0,91 und 0,65 ppm (19- und 18-Methyl); 3,58 ppm (15α-H); 4,15 ppm (Dublett mit  $J = 4$  Hz des 3β-OH); 4,71 ppm (Dublett mit  $J = 4$  Hz des 12α-OH) bei 3,9 ppm (2 H geminal zu –OH); bei 3,15 ppm (17α-H); 7,81, 7,52 und 6,29 (Pentadienolid) mit den für sie charakteristischen Kopplungen<sup>7)</sup>.



Die Fraktionen 20–24 (eluiert mit Benzol-Methanol-(94:6)) ergaben 74 mg amorphes Material, das noch wenig **7** enthielt.

Die Fraktionen 25–30 (eluiert mit Benzol-Methanol-(90:10)) ergaben 63 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 31–33 (eluiert mit Benzol-Methanol-(70:30)) ergaben weitere 74 mg amorphes Material.

b) Je 0,5 ml einer Lösung von 309 mg **9** vom Smp. 90 → 160–170° in 15 ml Methanol wurden nach 0, 2, 4 und 6 Std. zu 8 l-Liter-ERLENMEYER-Kolben gegeben, in welchen das Pilzmycel in je 100 ml Wasser suspendiert war. Die Kolben wurden insgesamt 9 Std. auf der rotierenden Maschine geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Mycels und Nachwaschen mit Methylenechlorid-Methanol-(9:1) wurde die wässrige Lösung dreimal mit Methylenechlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Die Auszüge ergaben nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 363 mg Rohprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Äther-Methanol-(95:5)) einen starken Fleck (A) von 12α-Hydroxyresibufogenin (**7**) (Rf-Wert 0,6), einen schwachen Fleck des Edukts (Rf-Wert 0,65) und 7β-Hydroxyresibufogenin (**10**) (Rf-Wert 0,4; Fleck B) und zwei sehr schwache Flecke (C und D) zeigte (Rf-Werte 0,45 und 0,25). Das Rohprodukt wurde an 25 g Kieselgel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 100 ml Lösungsmittel pro Fraktion (Äther mit steigenden Mengen Methanol).

Die Fraktionen 1–3 (eluiert mit Äther) ergaben 144 mg gelbes Öl; verworfen.

Die Fraktionen 4–7 (eluiert mit Äther-Methanol-(99:1)) ergaben 30 mg amorphes Material, das neben wenig Ausgangsmaterial vor allem **7** enthielt.

Die Fraktionen 8 und 9 (eluiert mit Äther-Methanol-(99:1)) ergaben 45 mg reines 12α-Hydroxyresibufogenin (**7**). Nach Umkristallisieren aus Nitromethan-Aceton Kristalle vom Smp. 153–155°.

Die Fraktionen 10–12 (eluiert mit Äther-Methanol-(99:1)) ergaben 27 mg amorphes Material, das neben **7** noch **10** enthielt.

Die Fraktionen 13–19 (eluiert mit Äther-Methanol-(99:1 bis 97:3)) ergaben 54 mg amorphes Material, das zur Hauptsache **10** enthielt. Aus Aceton-Äther 25 mg reines 7β-Hydroxyresibufogenin (3β,7β-Dihydroxy-14β,15β-epoxy-5β-Δ<sup>20,22</sup>-bufadienolid) (**10**) in Prismen vom Smp. 248–258° (Zers.).  $[\alpha]_D^{25} = +27^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,743$  in Methanol). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) (Fig. 4) zeigte Banden bei 3480 cm<sup>-1</sup> (–OH, rel. scharf), 1745 und 1715 cm<sup>-1</sup> (C=O, Pentadienolid) und 1535 cm<sup>-1</sup> (C=C, Pentadienolid).

C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	(400,5)	Ber. C 71,97	H 8,05%	Gef. C 71,11	H 8,26%
C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub> , H <sub>2</sub> O	(418,5)	„ „	68,87	„	8,16%

8. *Di-O-acetyl-12α-hydroxy-resibufogenin (8) aus 7*. 100 mg 12α-Hydroxyresibufogenin **7** vom Smp. 152–155° wurden mit 1,2 ml abs. Pyridin und 1,1 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 35° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum – zuletzt nach Zusatz von Benzol – resultierten 112 mg Rohprodukt, das an 5 g Silicagel mit Methylenechlorid-Methanol-(98:2) gereinigt wurde. Aus Äther-Methanol 98 mg reines **8** in Kristallen vom Smp. 208–217°.  $[\alpha]_D^{25} = +37^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,032$  in Chloroform). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) (Fig. 2) zeigte Banden bei 1730 cm<sup>-1</sup> (C=O, Acetyl und Pentadienolid), 1530 cm<sup>-1</sup> (C=C, Pentadienolid), 1230 cm<sup>-1</sup> (–OCOCH<sub>3</sub>) und 3020 cm<sup>-1</sup> (C–H, Epoxid). Das NMR.-Spektrum (Fig. 3) in CDCl<sub>3</sub> zeigte Signale bei : 0,99 und 0,84 ppm (19- und 18-Methyl); 2,05 und 2,12 ppm (Acetylgruppen); 3,66 ppm (15α-H); 5,10 und 4,97 ppm (3α-H und 12β-H); die Protonen des Pentadienolids bei 7,73, 7,22 und 6,25 ppm mit ihren charakteristischen Kopplungen<sup>7)</sup>.

9. *Di-O-acetyl-7β-hydroxy-resibufogenin (11) aus 10*. 18 mg nicht ganz reines 7β-Hydroxyresibufogenin (**10**) wurden mit 0,5 ml abs. Pyridin und 0,45 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 35° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum – zuletzt nach Zusatz von Benzol – resultierten 18 mg Rohprodukt, das an 2 g Silicagel mit Methylenechlorid-Methanol-(98:2) gereinigt wurde. Aus Äther-Petroläther 12 mg reines **11** vom Smp. 185–200°. Das NMR.-Spektrum in CDCl<sub>3</sub> zeigte Banden bei 0,80 und 1,04 ppm (18- und 19-Methyl); 2,03 und 2,06 ppm (Acetylgruppen); 3,61 ppm (15α-H); 5,1 und 4,8 ppm (breit) (2 H geminal zu den Acetoxygruppen) und die Protonen des Pentadienolidrings bei 6,25, 7,25 und 7,74 ppm mit den charakteristischen Kopplungen<sup>7)</sup>.

10. *KMnO<sub>4</sub>-Abbau von 3,12-Di-O-acetyl-12α-hydroxy-resibufogenin (8): 3β,12α-Diacetoxy-14β,15β-epoxy-14-anhydro-5β,14β,17αH-ätiansäure-methylester (15)*. Eine Lösung von 100 mg **8** vom Smp. 208–217° in 3 ml Aceton (frisch über KMnO<sub>4</sub> destilliert) wurde unter Rühren während 4 Std. portionsweise mit insgesamt 220 mg fein gepulvertem KMnO<sub>4</sub> versetzt (zu Beginn 125 mg, nach 30 Min. 50 mg, nach 2 Std. 45 mg KMnO<sub>4</sub>). Das braun gefärbte Gemisch wurde abgedampft, der Rückstand in 40 ml Wasser suspendiert und mit 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 1 gebracht. Hierauf wurde durch Einleiten von SO<sub>2</sub> unter Kühlung entfärbt und mit Chloroform-Äther-(4:1) ausgeschüttelt.

Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser und Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  resultierten 99 mg Rohprodukt, das in 10 ml Äther gelöst und mit frisch zubereiteter ätherischer Diazomethanlösung versetzt wurde. Nach Stehen während 15 Min. wurde eingedampft und der Rückstand (96 mg) an 30 g Silicagel mit Äther-Petroläther-(7:3) als Elutionsmittel chromatographiert (10 ml pro Fraktion).

Die Fraktionen 9–11 ergaben 34 mg amorphes Material, das im Dünnschichtchromatogramm einheitlich war, aber bisher nicht kristallisierte. Es handelt sich um den reinen Ester **15**.  $[\alpha]_D^{25} = +45^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,380$  in Methanol). Das IR.-Spektrum in Methylchlorid zeigte Banden bei  $1730\text{ cm}^{-1}$  (breit, C=O) und  $1225\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{OCOCH}_3$ ) und ist identisch mit dem IR.-Spektrum des aus **16** erhaltenen Abbaucesters.

11. *3,12-Bisdehydro-12 $\alpha$ -hydroxy-resibufogenin (13) aus 7*. Eine Lösung von 25 mg 12 $\alpha$ -Hydroxyresibufogenin (**7**) vom Smp.  $152\text{--}155^\circ$  in 2 ml reinstem Aceton wurde auf  $0^\circ$  abgekühlt und mit  $0,035\text{ ml CrO}_3$ -Lösung [**14**] ( $2,67\text{ g CrO}_3$ ;  $2,30\text{ ml H}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{H}_2\text{O}$  ad 10 ml) versetzt. Nach 10 Min. Rühren bei  $0^\circ$  wurde das Aceton im Vakuum entfernt, die wässrige Lösung dreimal mit Äther extrahiert, die Extrakte mit wenig Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 25 mg Rohprodukt, das im DC. neben wenig Ausgangsprodukt einen schnelleren Fleck zeigte (vermutlich 3-Dehydro-12 $\alpha$ -hydroxy-resibufogenin (**12**)). Das Rohprodukt wurde daher nochmals in 2 ml Aceton aufgenommen, mit  $0,035\text{ ml CrO}_3$ -Lösung versetzt, 10 Min. bei  $20^\circ$  stehengelassen und wie oben aufgearbeitet. Das Rohprodukt zeigte im DC. neben ganz wenig Ausgangsprodukt zwei unpolare Flecke von gleicher Stärke. Nach Chromatographie an 2 g Kieselgel mit Chloroform-Methanol-(96:4) als Lösungsmittel (Fraktionen zu 3 ml) resultierten aus den Fraktionen 1 und 2 11 mg rohes **13**, das aus Aceton-Äther Kristalle vom Smp.  $265\text{--}269^\circ$  lieferte. Das IR.-Spektrum in Methylchlorid zeigte Banden bei  $3025\text{ cm}^{-1}$  (schwach, C–H, Epoxid),  $1745$ ,  $1725$  und  $1715\text{ cm}^{-1}$  (C=O) und  $1540\text{ cm}^{-1}$  (C=C, Pentadienolid). Nach Misch-Smp. und IR.-Spektrum identisch mit dem aus 12 $\beta$ -Hydroxyresibufogenin (**14**) bereiteten 3,12-Bisdehydroresibufogenin (**13**).

Die Fraktionen 3–5 ergaben 7 mg rohes 3-Dehydro-12 $\alpha$ -hydroxy-resibufogenin (**12**), das aus Aceton-Äther Kristalle vom Smp.  $260\text{--}264^\circ$  lieferte. Das IR.-Spektrum in Methylchlorid zeigte neben den für **13** erwähnten Banden eine OH-Schwingung bei  $3590\text{ cm}^{-1}$ .

12. *Umsetzung von Mono-O-acetyl-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (17) mit Absidia orchidis*. Eine Lösung von 700 mg **17** vom Smp.  $170\text{--}175^\circ$ , bereitet nach [**16**], in 15 ml Methanol wurde auf 30 l-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, in welchen das Pilzmycel in je 200 ml Wasser suspendiert war. Nach Schütteln der Kolben auf der rotierenden Maschine während 8 Std. wurde das Mycel abfiltriert und ausgepresst (Lösung 1). Das gleiche Mycel wurde wiederum auf 25 l-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt und eine weitere Lösung von 450 mg **17** vom Smp.  $168\text{--}175^\circ$  in 15 ml Methanol zugegeben. Nach Schütteln während 11 Std. wurde das Mycel abfiltriert, ausgepresst und nachgewaschen (Lösung 2). Die Lösungen 1 und 2 wurden separat im Umlaufverdampfer im Vakuum auf  $800\text{ ml}$  eingeeengt und je viermal mit Methylchlorid-Methanol-(95:5) extrahiert. Die organischen Phasen wurden filtriert, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 981 mg bzw. 597 mg Rohprodukte, welche im Dünnschichtchromatogramm dieselben Flecke zeigten: ein Hauptprodukt (Fleck A) neben 3 polaren Nebenprodukten (Flecke B, C und D).

a) Die vereinigten Rohprodukte (1,58 g) wurden an 400 g Kieselgel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 45 ml Lösungsmittel (Methylchlorid-Methanol-(96:4)) pro Fraktion.

Die Fraktionen 1–44 ergaben 26 mg gelbes Öl; verworfen.

Die Fraktion 45 ergab 114 mg gelben Schaum, der neben wenig **17** unpolare Substanzen enthielt.

Die Fraktionen 46–49 ergaben 945 mg Rohprodukt, welches aus Aceton-Äther 265 mg Kristalle vom Smp.  $251\text{--}254^\circ$  lieferte und dem Fleck A auf dem Dünnschichtchromatogramm entspricht. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther reines 7 $\beta$ -Hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (**18**) vom Smp.  $253\text{--}255^\circ$ .  $[\alpha]_D^{25} = +64^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,492$  in Chloroform). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) (Fig. 5) zeigte Banden bei  $3520\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{OH}$ , relativ scharf),  $1780$  und  $1740\text{ cm}^{-1}$  (C=O, Butenolidring), und  $1630\text{ cm}^{-1}$  (C=C, Butenolidring). Das NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  (Fig. 6) zeigte Signale bei: 0,94 und 0,90 ppm (19- und 18-Methyl); 3,56 ppm (15 $\alpha$ -H); 3,87 und 3,5 ppm (H geminal zu  $-\text{OH}$ ); 4,18 und 4,04 ppm (Hydroxylprotonen); 4,82 und 5,92 ppm (Butenolidring).

$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$  (388,5) Ber. C 71,10 H 8,30% Gef. C 71,31; 71,44 H 8,29; 8,26%

Fraktion 50 ergab 93 mg amorphes Material. Aus Aceton-Äther 12 mg Kristalle vom Smp. 217–225°; vermutlich ein Hydroxylierungsprodukt von Progesteron. Das IR.-Spektrum in Methylchlorid zeigte Banden bei 3590  $\text{cm}^{-1}$  (–OH, nicht assoz.), 1705 und 1680  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, 20-Oxo bzw. 3-Oxo) und 1610  $\text{cm}^{-1}$  (C=C). UV.-Spektrum in Äthanol:  $\lambda_{\text{max}} = 243,5 \text{ nm}$ ;  $\epsilon = 16400$ .

Die Fraktionen 51–53 ergaben 118 mg amorphes Material, das im DC. uneinheitlich war und keine Kristalle lieferte.

Die Fraktionen 54–58 lieferten 57 mg amorphes Material, das aus Aceton 21 mg dicke Nadeln vom Smp. 253–255° ergab. Vermutlich liegt ein Monohydroxyderivat (**21**) von 14 $\beta$ ,15 $\beta$ -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin vor. Das IR.-Spektrum in KBr zeigte Banden bei 3370  $\text{cm}^{-1}$  (–OH, assoz.), 1785 und 1740  $\text{cm}^{-1}$  (C=O,  $\gamma$ -Lacton), 1752  $\text{cm}^{-1}$  (Fünfringketon?) und 1610  $\text{cm}^{-1}$  (C=C).

Die Fraktionen 45–62 ergaben 89 mg amorphes Material, das noch «Gemisch B» enthielt.

Die Fraktionen 63–85 ergaben 26 mg polares Material, das nicht weiter untersucht wurde.

Die Fraktionen 59–98 ergaben 111 mg polare Substanzen, die u. a. die Flecke C und D enthielten. Nicht weiter untersucht.

b) *Isolierung des Substanzgemisches B.* Die angefallenen Mutterlaugenrückstände und uneinheitlichen Fraktionen (Fraktionen 45–58) der obigen Chromatographie (total 1,02 g) wurden nochmals an 450 g Kieselgel chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Methylchlorid-Methanol (94:6) in Fraktionen zu 40 ml.

Die Fraktionen 1–14 ergaben 9 mg gelbes Öl; verworfen.

Die Fraktionen 15–22 ergaben 188 mg gelbliches Material, das u. a. **18** enthielt.

Die Fraktionen 23–30 (198 mg) ergaben aus Aceton-Äther 89 mg reines **18** vom Smp. 250–254°.

Die Fraktionen 31–35 lieferten 23 mg im DC. uneinheitliches Rohprodukt.

Die Fraktionen 36–44 ergaben 329 mg amorphe Substanz, die im DC. nur einen Fleck (Fleck B) zeigte, deren NMR.-Spektrum aber ein Gemisch zweier Substanzen im Verhältnis von ca. 1:1 erkennen liess (Gemisch B der Substanzen B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>).

13. *Di-O-acetyl-7 $\beta$ -hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (19) aus 18.* 177 mg 7 $\beta$ -Hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (**18**) vom Smp. 251–254° wurden mit 3 ml abs. Pyridin und 2,8 ml Acetanhydrid 22 Std. bei 35° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum – zuletzt nach Zugabe von Benzol – resultierten 189 mg Rohprodukt, das an 50 g Silicagel mit Methylchlorid-Methanol (98:2) gereinigt wurde. Aus Äther-Pentan 135 mg reine Kristalle vom Smp. 192–194°.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +32,5 \pm 2^\circ$  ( $c = 1,416$  in Chloroform). Das IR.-Spektrum in Methylchlorid zeigte Banden bei 1790 und 1745  $\text{cm}^{-1}$  (C=O,  $\gamma$ -Lactonring), 1725  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, Acetat) und 1235  $\text{cm}^{-1}$  (–OCOCH<sub>3</sub>). Das NMR.-Spektrum in CDCl<sub>3</sub> zeigte Signale bei 1,06 und 0,96 ppm (19- und 18-Methyl); 2,00 und 2,05 ppm (Acetylgruppen); 3,58 ppm (15 $\alpha$ -H); 5,09 und um 4,8 ppm (H geminal zu Acetyl) und 4,78 sowie 5,83 ppm (Protonen des Butenolidrings mit den charakteristischen Kopplungen).

14. *Di-O-acetyl-7 $\alpha$ -hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (16) aus dem Gemisch B.* 300 mg des amorphen Gemisches B wurden mit 1,8 ml abs. Pyridin und 1,5 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 35° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum – zuletzt unter Zugabe von Benzol – zeigte das Rohprodukt im Dünnschichtchromatogramm nur einen Fleck. Es wurde an Kieselgel mit Methylchlorid-Methanol (97:3) als Elutionsmittel (Fraktionen zu 50 ml) chromatographiert. Nach Abtrennen der ersten 500 ml (verworfen) ergaben die Fraktionen 1 und 2 3 mg Öl; verworfen. Fraktion 3 ergab 9 mg im DC. unreine Substanz. Die Fraktionen 4–6 (236 mg) ergaben nach längerem Stehenlassen aus Äther-wenig Pentan 105 mg feine Kristalle vom Smp. 198–200°. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äther-Pentan reine Kristalle vom Smp. 199–202°.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +111^\circ$  ( $c = 0,987$  in Chloroform). Das IR.-Spektrum in Methylchlorid zeigte die typischen Banden des ungesättigten  $\gamma$ -Lactonrings, sowie der Acetylgruppen. Das NMR.-Spektrum in CDCl<sub>3</sub> zeigte Signale bei : 1,005 und 1,00 ppm (18- und 19-Methyl); 2,07 und 2,13 ppm (Acetylgruppen); 3,65 ppm (15 $\alpha$ -H); 2,98 ppm und der Kopplungskonstante  $J = 10 \text{ Hz}$  (17 $\alpha$ -H); bei 5,05 ppm (zwei H geminal zu den Acetoxygruppen) und 4,80 sowie 5,86 ppm (Butenolidringprotonen mit den charakteristischen Kopplungen).

$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_7$  (472,6) Ber. C 68,62 H 7,68% Gef. C 68,82 H 7,89%

Die Fraktion 7 ergab 19 mg im DC. unreine Substanz.

Die Fraktionen 9–15 ergaben 21 mg polarere Nebenprodukte, die nicht weiter untersucht wurden.

Aus den Mutterlaugenrückständen von **16** (130 mg) konnten keine weiteren Kristalle erhalten werden.

15. *Di-O-acetyl-7 $\beta$ -hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (19)* aus *Di-O-acetyl-7 $\beta$ -hydroxy-digitoxigenin (20)*. Eine Lösung von 62 mg **20** vom Smp. 161–164° in 1 ml abs. Pyridin wurde bei 0° mit 0,25 ml SOCl<sub>2</sub> versetzt und 2 Std. bei 0° stehengelassen. Hierauf wurde mit Eis zerlegt und die gelbe Lösung dreimal mit Methylenechlorid ausgeschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit 2N HCl und NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen resultierten 57 mg Rohprodukt, welches im Dünnschichtchromatogramm einheitlich war (reiner Äther, Rf-Wert: 0,5; Rf-Wert von **20**: 0,4) und an Kieselgel (15 g) mit Äther als Lösungsmittel gereinigt wurde. Aus Pentan-wenig Aceton kristallisierten 31 mg *Di-O-acetyl-7 $\beta$ -hydroxy-14-anhydro-digitoxigenin* vom Smp. 123,5–127°.  $[\alpha]_D^{25} = -15^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,944$  in Chloroform). Das IR.-Spektrum (in Methylenechlorid) zeigte Banden bei 1785 und 1750 cm<sup>-1</sup> (C=O, Lactonring); 1725 cm<sup>-1</sup> (C=O, Acetat); 1630 cm<sup>-1</sup> (C=C, scharf) und 1230 cm<sup>-1</sup> (–OCOCH<sub>3</sub>). Es sind keine OH-Banden zu sehen.

Eine Lösung von 25 mg obiger Kristalle in 1,5 ml Aceton wurde mit 25 mg N-Bromacetamid (frisch aus heissem Benzol umkristallisiert) in 0,5 ml Wasser versetzt und 16 Std. bei 20° stehengelassen. Darauf wurde das Aceton im Vakuum entfernt, wenig Wasser zugegeben und viermal mit Methylenechlorid extrahiert. Nach zweimaligem Waschen der Extrakte mit Wasser und Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> resultierten 23 mg Rohprodukt, das an 20 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Aktivitätsstufe II–III) chromatographiert wurde. Als Elutionsmittel diente Äther-Methanol-(98:2) in Fraktionen zu 5 ml. Nach Abtrennung von 35 ml Lösungsmittel ergaben die Fraktionen 1–3 2 mg amorphes Material, das nicht weiter untersucht wurde. Die Fraktionen 4–7 (7 mg) ergaben aus Äther-Petroläther verfilzte Nadelchen vom Smp. 235–242°. Im DC. einheitlich. Das IR.-Spektrum in Methylenechlorid zeigte die Banden von **19** mit zusätzlichen stärkeren Banden im Fingerprintgebiet bei 1370, 1240, 1210 und um 870 cm<sup>-1</sup>.

Die Fraktionen 8–11 (10 mg) lieferten aus Äther-Petroläther reines *Di-O-acetyl-7 $\beta$ -hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (19)* in feinen Warzen vom Smp. 192–194°. Im DC. einheitlich. Das IR.-Spektrum in Methylenechlorid zeigte die typischen Banden des Butenolidrings und der Acetylgruppen. Nach Misch-Smp., DC. und IR.-Spektrum mit dem aus **17** über **18** gewonnenen Präparat identisch.

16. *Abbau von Di-O-acetyl-12 $\alpha$ -hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (16)* mit O<sub>3</sub> usw. zu *3 $\beta$ ,12 $\alpha$ -Diacetoxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ -H-Ätiansäure-methylester (15)*. In eine Lösung von 80 mg **16** vom Smp. 198–200° in 7 ml Essigester (mit basischem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> getrocknet) wurde während 10 Min. bei –70° ein 4proz. O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>-Gemisch eingeleitet (Geschwindigkeit 100 ml/Min.) und bei –70° während 80 Min. stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum bei 20° wurde das rohe Ozonid in 1,5 ml Eisessig gelöst und mit einem Tropfen Wasser sowie mit Zn-Staub in drei kleinen Portionen versetzt und kurze Zeit geschüttelt. Nach Filtration und zweimaligem Nachwaschen mit Wasser, Ausschütteln mit Methylenechlorid, Trocknen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen im Vakuum resultierten 84 mg Rohprodukt. Dieses wurde in 5 ml Methanol gelöst und mit 2 ml einer kalt zubereiteten Lösung von 2,3 g NaHCO<sub>3</sub> in 60 ml Wasser versetzt. Nach Rühren während 20 Std. bei 20° wurde das Methanol im Vakuum entfernt und die wässrige Suspension fünfmal mit Methylenechlorid extrahiert. Die Auszüge wurden mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Es resultierten 64 mg Rohprodukt (Ketol), das in 3 ml reinstem Methanol gelöst und mit 40 mg H<sub>5</sub>JO<sub>6</sub> in 1 ml Wasser versetzt wurde. Nach 14 Std. Stehen im Dunkeln bei 20° wurde das Methanol im Vakuum entfernt, die Lösung viermal mit Methylenechlorid extrahiert, mit wenig Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Es resultierten 59 mg rohe Ätiansäure, die in Äther gelöst und mit einem knappen Überschuss an frisch bereiteter Diazomethanolösung versetzt wurde. Nach 10 Min. Stehen wurde eingedampft. Es resultierten 60 mg roher Ätiansäure-methylester, der im Dünnschichtchromatogramm einen einzigen Fleck zeigte (reiner Äther, Rf-Wert 0,6). Das Rohprodukt wurde an 40 g Kieselgel mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert.

Die ersten 60 ml Lösung ergaben 3 mg Öl; verworfen.

Die Fraktionen 1–4 (zu je 8 ml) ergaben 47 mg reinen *3 $\beta$ ,12 $\alpha$ -Diacetoxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ -H-Ätiansäure-methylester (15)*, der bisher nicht kristallisierte.  $[\alpha]_D^{25} = +46,5^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,160$  in Methanol). Das IR.-Spektrum in Methylenechlorid zeigte Banden bei 1730 cm<sup>-1</sup> (C=O, Ester) und 1230 cm<sup>-1</sup> (–OCOCH<sub>3</sub>) und ist identisch mit dem IR.-Spektrum des aus **8** erhaltenen Abbauesters.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 15. Mitteilung: M. SCHERRER-GERVAI, L. GSELL & CH. TAMM, *Helv.* **52**, 142 (1969).  
 [2] a) CH. TAMM & A. GUBLER, *Helv.* **42**, 473 (1959); b) M. OKADA, M. MASUNUMA & Y. SAITO, *J. Pharmac. Soc. (Jap.)* **85**, 1092 (1965).  
 [3] M. SCHÜPBACH & CH. TAMM, *Helv.* **47**, 2217 (1964).  
 [4] M. SCHÜPBACH & CH. TAMM, *Helv.* **47**, 2225 (1964).  
 [5] O. HANČ, A. ČAPEK & B. KAPAČ, *Folia Microbiologica* **6**, 392 (1961); V. SCHWARZ, M. ULRICH & K. SYHORA, *Steroids* **4**, 645 (1964).  
 [6] Y. NOZAKI, H. ISHII, T. OKUMURA, «Collection of Lectures Commemorating the Inauguration of the New Shionogi Research Laboratory Building», p. 227, Shionogi & Co. Ltd, Fukushima-ku, Osaka, Japan (1963).  
 [7] G. AMBRUS & G. WIX, *Acta chim. hung.* **55**, 99 (1968).  
 [8] Y. NOZAKI, *Agr. biol. Chemistry (Jap.)* **25**, 884, 890 (1961).  
 [9] T. OKUMURA, Y. NOZAKI & D. SATOH, *Chem. pharmaceut. Bull.* **11**, 1340 (1963); **12**, 1143 (1964).  
 [10] Y. NOZAKI, E. MASUO & D. SATOH, *Agr. biol. Chemistry (Jap.)* **26**, 399 (1962).  
 [11] M. KOTAKE & K. KUWADA, *Sc. Inst. physic. chem. Research (Tokio)* **36**, 106 (1939); vgl. C. 1939 II, 1681; K. MEYER, *Pharmaceut. Acta Helv.* **24**, 222 (1949); K. MEYER, *Helv.* **32**, 1238 (1949).  
 [12] E. TITUS, A. W. MURRAY & H. E. SPIEGEL, *J. biol. Chemistry* **235**, 3399 (1960); H. ISHII, Y. NOZAKI, T. OKUMURA & D. SATOH, *J. pharmaceut. Soc. (Jap.)* **80**, 1150 (1960); G. JUHASZ & CH. TAMM, *Helv.* **41**, 1063 (1961).  
 [13] K. MEYER, *Helv.* **35**, 2444 (1952); H. LINDE & K. MEYER, *Pharmaceut. Acta Helv.* **33**, 327 (1958); H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **42**, 807 (1959).  
 [14] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* **1964**, 39.  
 [15] L. GSELL & CH. TAMM, *Helv.* **52** (1969), im Druck.  
 [16] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **45**, 1041 (1962).  
 [17] G. R. DUNCAN, *J. Chromatography* **8**, 37 (1962).  
 [18] E. STAHL, «Dünnschichtchromatographic», 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1967; K. RANDEARTH, «Dünnschichtchromatographie», Verlag Chemie, Weinheim 1962.  
 [19] 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).

## 15. Synthese der Purpurin-8-carbonsäure; Beitrag zum Boletol-Problem

Vorläufige Mitteilung<sup>1)</sup>

von A. Bräm<sup>2)</sup> und C.H. Eugster

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich

(3. XII. 68)

*Zusammenfassung.* Eine neue und in bezug auf die Stellung der Substituenten eindeutige Synthese von Methoxybenzanthronen wird beschrieben. Oxydativer Abbau an 1,8,10,11-Tetramethoxybenzanthron führte zu 5,7,8-Trihydroxy-anthrachinon-1-carbonsäure; an 1,8,11-Trihydroxybenzanthron zu 5,8-Dihydroxyanthrachinon-1-carbonsäure. 5,7,8-Trihydroxy-anthrachinon-1-carbonsäure ist weder mit «Boletol» noch mit «Isoboletol» von KÖGL & DEIJS identisch.

Erneute Isolierung der mit Oxydasen blau werdenden Farbstoffe aus *Boletus satanas*, *B. luridus* und *B. calopus* gab kein «Boletol», sondern in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren *Variiegatsäure* (Luridussäure) und weitere Verbindungen.

Boletol ist vorderhand als Naturprodukt zu streichen.

<sup>1)</sup> Eine ausführliche Mitteilung soll in dieser Zeitschrift erscheinen.

<sup>2)</sup> Dissertation A. BRÄM, Universität Zürich, in Vorbereitung.