

MECHANISMUS DER BASENKATALYSIERTEN REAKTION VON CARDENOLIDEN—I

ABHÄNGIGKEIT VOM LÖSUNGSMITTEL*

C. LINDIG und K. R. H. REPKE

Institut für Biochemie im Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch, DDR

(Received in Germany 27 October 1971; Received in the UK for publication 23 November 1971)

Zusammenfassung—Kinetische Untersuchungen zur basenkatalysierten Isomerisierung von Cardenoliden (vor allem 17 α -Digitoxigenin **1** und Digitoxigenin **10**) ergeben eine starke Abhängigkeit des Reaktionsmechanismus vom angewandten Lösungsmittel. In wässriger Kalilauge bewirkt der Angriff eines Hydroxylions primär eine Hydrolyse des Butenolidrings zu den α,β -ungesättigten γ -Hydroxy-carbonsäuren **2** bzw. **11**. Diese werden nur noch sehr langsam durch Verlagerung der Doppelbindung in die β,γ -Stellung über die Aldenole **7** bzw. **12** zu den γ -Aldehyd-carbonsäuren **3** bzw. **13** umgewandelt, die in neutraler Lösung mit ihrem cyclischen Halbacylat **4** bzw. cyclischen Halbacetal **16** im Gleichgewicht stehen. In absolut methanolischer Kalilauge bewirkt der Angriff des stärker basischen Methoxylations die Bildung der Furylanionen **8** bzw. **14**. Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend und wird durch zusätzliche OH-Gruppen in 12 β -, 16 α - oder 16 β -Stellung von **10** beschleunigt. **8** addiert Methanol unter Bildung des Methoxylactons **5**. Dagegen bildet **14** durch intramolekulare Addition der 14 β -OH-Gruppe an den Furylring das 14,21-Epoxy-cardanolid **15**. In wässrig-methanolischer Kalilauge konkurrieren sowohl primäre Hydrolyse der Cardenolide **1** und **10** als auch Hydrolyse der Isomerisierungsprodukte **5** bzw. **15** zu den γ -Aldehyd-carbonsäuren **3** bzw. **13**.

Abstract—The mechanism of base-catalysed isomerization of cardenolides, using mainly 17 α -digitoxigenin (**1**) and digitoxigenin (**10**) as test compounds, has been studied by means of kinetic analyses. The solvent used is shown to determine decisively reaction course and speed of isomerization. In aqueous potassium hydroxide solution, the attack of the OH ion primarily effects the hydrolysis of the butenolide ring to furnish the α,β -unsaturated γ -hydroxycarbonic acids **2** or **11**. In these compounds the double bond is shifted very slowly to β,γ -position, yielding by rearrangement of the aldenols **7** or **12** the γ -aldehyde carbonic acids **3** or **13** as isomerization products, which, on neutralization, are in equilibrium with the cyclic semiacylate **4** or the cyclic semiacetal **16**. In absolute methanolic potassium hydroxide solution, the attack of the more basic methoxylate ion effects the formation of the furyl anions **8** or **14**. This is shown to be the rate-limiting step of isomerization, accelerated by additional OH groups in 12 β -, 16 α - or 16 β -position of **10**. **8** adds methanol to yield methoxy lactone **5**. However, **14** by an intramolecular addition of the 14 β -OH group to the furyl ring forms 14,21-epoxide **15**. In aqueous methanolic potassium hydroxide solution, both initial hydrolysis of the cardenolides **1** or **10** and hydrolysis of the isomerization products **5** or **15** competitively take place, yielding the γ -aldehyde carbonic acids **3** or **13**.

CARDENOLIDE können unter Baseneinwirkung neben einer Verseifung des Lactonrings eine irreversible Umlagerung zu 14,21- oder 16,21-Epoxycardanoliden (früher Isoverbindungen genannt) erfahren. Die Bildung der Epoxycardanolide, im folgenden kurz mit Isomerisierung bezeichnet, ist wiederholt untersucht und interpretiert worden.²⁻⁷ Die zum Teil widersprüchlichen Deutungen des Reaktionsmechanismus, die sich ausschliesslich auf die Charakterisierung der Endprodukte der Isomerisierung gründen, stehen nicht im Einklang mit den Ergebnissen unserer reaktionskinetischen Unter-

* 23. Mitteilung über Untersuchungen an herzwirksamen Steroiden; 22. Mitteilung.¹

suchungen, über die bisher nur sehr kurz berichtet wurde.⁸ In der vorliegenden Mitteilung werden der Mechanismus der Isomerisierung und seine Abhängigkeit vom Lösungsmittel beschrieben. Die Rolle der Temperatur wird in einer weiteren Mitteilung behandelt.⁹

A. Reaktionsprodukte der Baseneinwirkung auf 17α -Digitoxigenin*

Zwecks Erfassung von Teilreaktionen der Isomerisierung wurde zunächst 17α -Digitoxigenin (**1**) untersucht, bei dem die Ausbildung der 14,21-Epoxidbrücke aus sterischen Gründen (trans-Stellung des 17α -ständigen Lactonrings und der 14β -OH-Gruppe) nicht möglich ist.

In wässriger KOH entsteht aus **1** durch direkte Lactonringverseifung die α,β -ungesättigte γ -Hydroxy-carbonsäure $3\beta,14,21$ -Trihydroxy-24-nor- $5\beta,14\beta,17\alpha$ -chol-20(22)-en-23-säure (**2**), die sich wegen ihrer starken Lactonisierungstendenz nicht isolieren lässt. Bei den später zu beschreibenden kinetischen Untersuchungen wurde daher **2**, nach extraktiver Entfernung des nichtumgesetzten **1** aus alkalischer Lösung, re-lactonisiert und gleichfalls als **1** bestimmt.

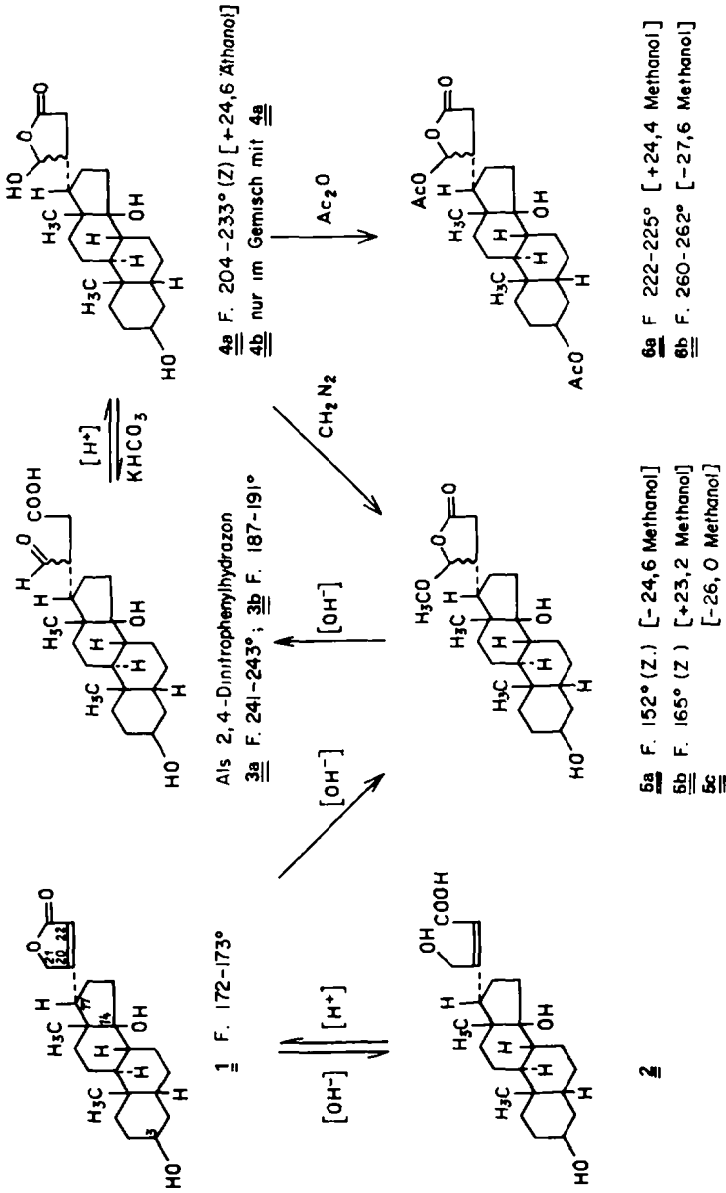
In methanolischer KOH entsteht zunächst $3\beta,14$ -Dihydroxy-21 ξ -methoxy- $5\beta,14\beta,17\alpha,20\xi$ -cardanolid (**5**), das als gesättigtes γ -Lacton leicht hydrolysiert¹ und daher nur während der ersten Minuten der Alkalieinwirkung nachweisbar ist. Als Endprodukt der Hydrolyse entsteht die γ -Aldehydcarbonsäure $3\beta,14$ -Dihydroxy-21-oxo-24-nor- $5\beta,14\beta,17\alpha,20\xi$ -cholan-23-säure (**3**), wobei vermutlich als Zwischenprodukt das Halbacetal $3\beta,14,21\xi$ -Trihydroxy-21-methoxy-24-nor- $5\beta,14\beta,17\alpha,20\xi$ -cholan-23-säure (**9**) auftritt. **3** bildet erwartungsgemäss ein 2,4-Dinitrophenylhydrazon. Dagegen fielen die Aldehydreaktionen bei den von Jacobs *et al.* untersuchten "Isosäuren" der 17β -Reihe negativ aus,¹¹ weil sich die Aldehydgruppe offenbar infolge Cyclohalb-acetal-Bildung mit 14β -OH (Ausbildung der 14,21-Epoxidbrücke) dem Nachweis entzieht.

Nach Ansäuern der alkalischen Lösung von **3** wird das cyclische Halbacylat $3\beta,14,21\xi$ -Trihydroxy- $5\beta,14\beta,17\alpha,20\xi$ -cardanolid (**4**) erhalten. Von den theoretisch möglichen vier optischen Isomeren (zwei Asymmetriezentren an C-20 und C-21) können zwei dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden. Durch Säulenchromatographie lässt sich nur das schneller wandernde Isomere **4a** rein abtrennen. Aus einer Lösung in Chloroform geht **4a** beim Verschütteln mit Kaliumbicarbonatlösung quantitativ in die wässrige Phase über, wonach schon in schwach alkalischer Lösung das Gleichgewicht zwischen **3** und **4** ganz auf Seiten von **3** liegt. Nach dem Ansäuern der wässrigen Phase wird erneut das Isomerengemisch **4a/4b** erhalten.

Die Konstitution von **4a** ergibt sich aus Elementaranalyse, Massenspektrum und vor allem Infrarot-Spektrum. Die Absorptionsbande für die C=C-Bindung und die für den Butenolidring typische Aufspaltung der Carbonylbande¹² sind verschwunden. Die Frequenz der Carbonylbande ist vermindert (1745 cm^{-1}). Die neuauftretene starke Bande bei 933 cm^{-1} , die für eine Dioxymethingruppe charakteristisch ist, lässt auf das Vorliegen eines γ -Hydroxybutanolidringes schliessen.

Bei der Methylierung des Isomerengemisches **4a/4b** mit Diazomethan wird $3\beta,14$ -

* Bezeichnung der Verbindungen nach "IUPAC-IUB 1967, überarbeitete vorläufige Regeln zur Steroid-Nomenklatur".¹⁰



Dihydroxy-21 ξ -methoxy-5 β ,14 β ,17 α ,20 ξ -cardanolid (**5**) erhalten, das sich durch Säulenchromatographie in die Isomeren **5a**, **5b** und **5c** trennen lässt. Bei der Einwirkung von wässriger oder wässrig-methanolischer 0.5n KOH entsteht aus jedem der Methoxy-cardanolide die γ -Aldehyd-carbonsäure **3**, die in Form der isomeren γ -Hydroxylactone **4a** und **4b** nachgewiesen wurde. Die Acetylierung des Isomeren-gemisches **4a/4b** liefert 3 β ,21 ξ -Diacetoxy-14-hydroxy-5 β ,14 β ,17 α ,20 ξ -cardanolid (**6**), das sich durch Säulenchromatographie in die Isomeren **6a** und **6b** trennen lässt. Gesättigte γ -Hydroxy-lactone als Produkte basenkatalysierter Reaktionen von Cardenoliden wurden bisher nur aus Δ^{14} -Anhydrostrophanthidin^{6,7} und aus 17 α -Digitoxigenin (diese Arbeit) erhalten, bei denen sich infolge Fehlens der 14 β -OH-Gruppe oder aus sterischen Gründen kein 14,21-Epoxycardanolid bilden kann.

B. Lösungsmittel-Einfluss auf Verseifung und Isomerisierung

Nach vollständiger Umsetzung von **1** in wässriger, wässrig-methanolischer oder methanolischer Kalilauge werden charakteristische Unterschiede im Verhältnis von α,β -ungesättigter γ -Hydroxy-carbonsäure **2** zur γ -Aldehyd-carbonsäure **3** gefunden.

TABELLE 1. EINFLUSS VON WASSER UND METHANOL AUF DIE BILDUNG DER α,β -UNGESÄTTIGTEN γ -HYDROXY-CARBONSÄURE **2** UND DER γ -ALDEHYD-CARBONSÄURE **3** NACH VOLLSTÄNDIGER UMSETZUNG VON 17 α -DIGITOXIGENIN (**1**) IN 0.5n KOH BEI 20° ($t = 1$ Std.)

Wasser/Methanol*	Produkt in % (bezogen auf eingesetztes 1)	
	2	3
100: 0	94	6
80: 20	53	47
60: 40	24	76
40: 60	12	88
20: 80	4	96
0:100	0	100

* Alle Angaben über Lösungsmittelgemische beziehen sich auf Raumteile.

Wie die Tabelle zeigt, überwiegt in wässriger Lösung die Verseifung (**1** \rightarrow **2**) und steigt mit Erhöhung des Methanolgehalts die Isomerisierung (**1** \rightarrow **3**) an.

C. Mechanismus der Bildung von 3 β ,14-Dihydroxy-21-oxo-24-nor-5 β ,14 β ,17 α ,20 ξ -cholan-23-säure (**3**)

Die Umsetzung des Lactons **1** in 0.5n KOH bei 20° ist sowohl in wässrig-methanolischer Lösung (Abb 1) als auch in wässriger Lösung (nicht demonstriert) nach einer Stunde beendet. Innerhalb dieses Zeitraums, in dem also noch unverseiftes Lacton vorliegt, verläuft die Isomerisierung relativ rasch. Dagegen erfolgt die Isomerisierung in der anschliessenden Phase, in der neben Isomerisierungsprodukten nur noch α,β -ungesättigte γ -Hydroxy-carbonsäure **2** vorhanden ist, vergleichsweise sehr langsam (Abb 2). Der beschriebene Zweiphasenverlauf der Isomerisierung wird in

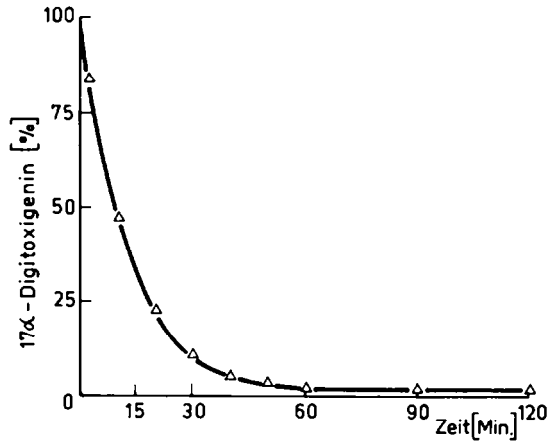


ABB 1. Kinetik der Umsetzung von 17α -Digitoxigenin (1) in wässrig-methanolischer (80:20) 0.5 n KOH bei 20° .

allen untersuchten Wasser-Methanol-Gemischen gefunden, nur dass mit steigendem Alkoholgehalt der Prozentsatz an Isomerisierungsprodukten zunimmt.

Die Kinetik der Umsetzung von **2** in 0.5 n KOH bestätigt, dass **2** der Isomerisierung, wenn überhaupt, nur sehr langsam unterliegt (Abb 2). Beispielsweise wird **2** nach 3-stündiger Einwirkung von wässriger KOH praktisch quantitativ zurückerhalten und in wässrig-methanolischer KOH (20% Methanol) nur zu etwa 11% isomerisiert.

Die in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Ergebnisse widerlegen die Annahme von Makaritschew u. Abubakirow,⁷ dass die solvolytische oder hydrolytische Öffnung des Lactonrings der erste Schritt der basenkatalysierten Isomerisierung der Cardenolide ist; sie zeigen vielmehr, dass die schnelle Isomerisierung durch

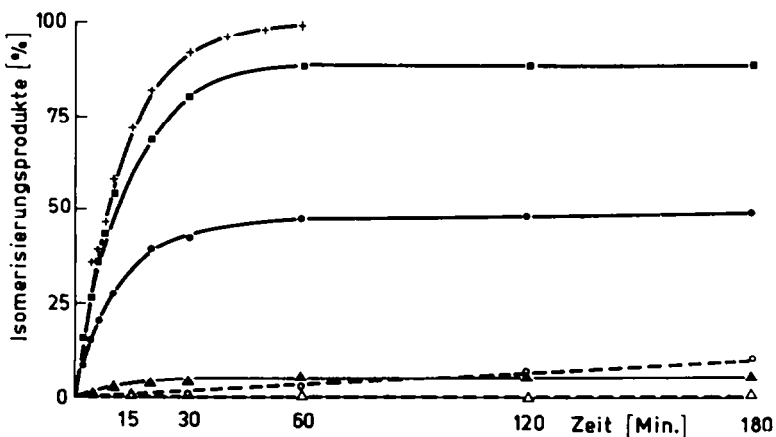
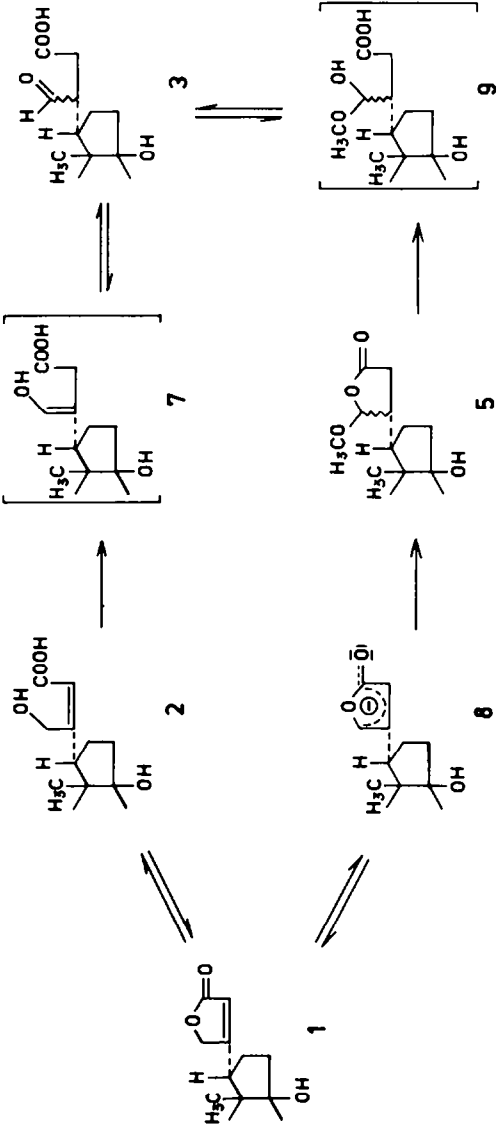


ABB 2. Einfluss des Lösungsmittels auf die Kinetik der Isomerisierung von 17α -Digitoxigenin (1) (durchgezogene Linien) und der durch Verseifung von **1** gebildeten $3\beta,14,21$ -Trihydroxy-24-nor-5 β ,14 β ,17 α -chol-20-en-23-säure (**2**) (gestrichelte Linien) durch 0.5 n KOH bei 20° .
 ▲—▲ Wasser, ●—● Wasser-Methanol (8:2), ■—■ Wasser-Methanol (4:6), +—+ Methanol; Δ — Δ Wasser, ○—○ Wasser-Methanol (8:2) (s. exp. Teil).

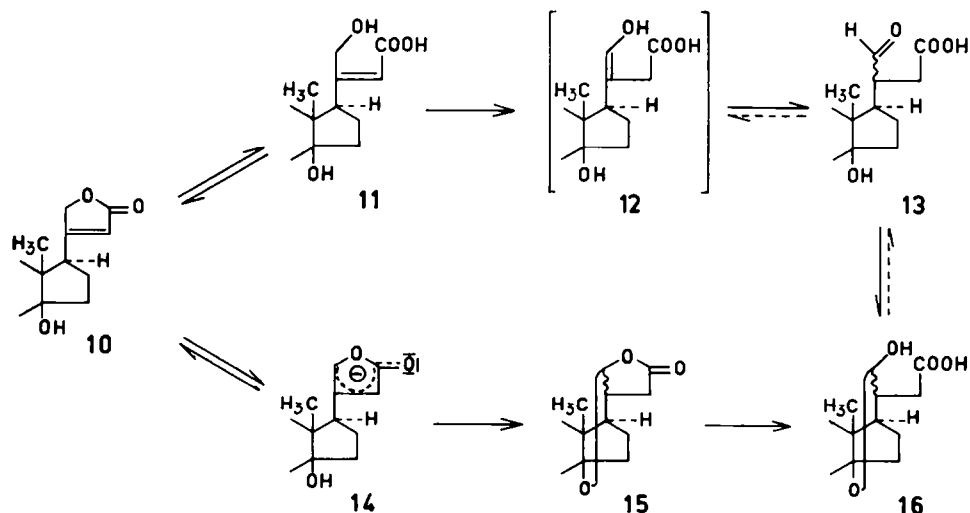


methanolische oder methanolisch-wässrige KOH die Lactonkonfiguration sogar voraussetzt. Unter Berücksichtigung der Lösungsmittelabhängigkeit des Reaktionsverlaufs (Tabelle) lassen sich aus der Kinetik der Umsetzungen (Abb 1 und 2) folgende Schlussfolgerungen für den Mechanismus der Isomerisierung von 1 ziehen.

In *methanolischer* KOH wird durch den Angriff des Methyllations auf ein H-Atom an C-21 primär das mesomere Furylanion 8 gebildet.* Das durch Addition von Methanol an 8 gebildete Methoxy-lacton 5 wird als gesättigtes Lacton schnell verseift,¹ wobei über das Halbacetal 9 die γ -Aldehyd-carbonsäure 3 entsteht. In *wässriger* KOH wird unter dem Einfluss des weniger basischen Hydroxylions das Furylanion 8 nur so langsam gebildet, dass 1 vorwiegend zur α,β -ungesättigten γ -Hydroxy-carbonsäure 2 verseift wird. In 2 wird die Doppelbindung unter weiterer Baseneinwirkung kaum oder, bei Zusatz von Methanol, nur sehr langsam von α,β - nach β,γ -Stellung verlagert. Die dabei zunächst gebildete Enolform 7 der γ -Aldehyd-carbonsäure lagert sich sofort in die Aldehydform 3 um.

D. Bedeutung der Konfiguration an C-17 für den Verlauf der Isomerisierung und geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Isomerisierung

Der Isomerisierungsverlauf ist beim Digitoxigenin (10) in ähnlicher Weise vom Lösungsmittel abhängig wie bei 1. In wässriger KOH findet vorwiegend Verseifung zur α,β -ungesättigten γ -Hydroxy-carbonsäure 11 statt. In methanolischer KOH erfolgt vorzugsweise Isomerisierung über das Furylanion 14. Im Gegensatz zu 1 ist jedoch bei 10 infolge *cis*-Stellung des Lactonrings zur 14 β -OH-Gruppe die Bildung des 14,21-Epoxycardenolids 15 möglich. In Bestätigung eines Befundes von Jacobs und Gustus⁴ haben wir gefunden, dass aus einer konzentrierten Lösung von 10 in methanolischer KOH bereits nach 10 Minuten die kristalline Abscheidung von 15 beginnt. Die Bildung von 15 ohne Öffnung des Lactonrings kann auch in verdünnter Lösung bei Einwirkung von methanolischer oder wässrig-methanolischer 0.5n KOH



* Die Existenz des Furylanions wurde von Kuritzkes *et al.*¹³ postuliert und von F. Dittrich in unserem Labor nachgewiesen (Publikation in Vorbereitung).

beobachtet werden, solange der Wassergehalt 10% nicht überschreitet. Mit steigendem Wassergehalt wird das primär gebildete **15** mit zunehmender Geschwindigkeit zum cyclischen Halbacetal **16** verseift. Beispielsweise ist bei Einwirkung von wässrig-methanolischer (1:1) 0.5n KOH bei 20° das eingesetzte **15** bereits nach 5 Minuten nahezu quantitativ zu **16** verseift. Unter diesen Bedingungen übertrifft die Geschwindigkeit der Verseifung die der Bildung von **15** erheblich, so dass **15** als Intermediärprodukt nicht nachweisbar ist.

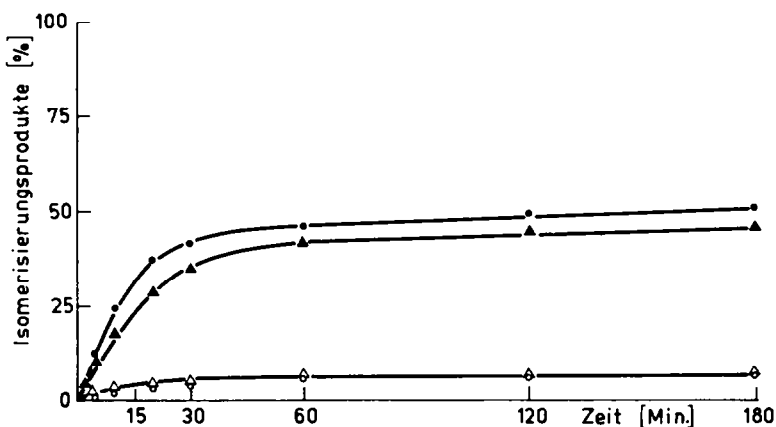


ABB 3. Bedeutung der Konfiguration an C-17 für die Kinetik der Isomerisierung bei 20°. 17α-Digitoxigenin (**1**) in wässriger (○-○) und wässrig-methanolischer (8:2) (●-●) 0.5 n KOH; Digitoxigenin (**10**) in wässriger (△-△) und wässrig-methanolischer (8:2) (▲-▲) 0.5 n KOH.

Aus der direkten Bildung von **15** aus **10** ist zu schliessen, dass beim Furylanion **14** die intramolekulare Addition der 14β-OH-Gruppe gegenüber der Addition von Methanol aus dem Reaktionsmedium stark bevorzugt ist. Wären die Additionsreaktionen **14** → **15** bzw. **8** → **5** jeweils die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Isomerisierung, dann müsste **10** wesentlich schneller als **1** isomerisiert werden. Die Isomerisierung von **10** verläuft aber umgekehrt sogar etwas langsamer als die von **1** (Abb 3). Daraus ist zu schliessen, dass die Bildung des Furylanions **14** bzw. **8** nicht nur der primäre, sondern auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Isomerisierung ist.

E. Einfluss einer zusätzlichen Hydroxygruppe auf die Kinetik der Isomerisierung

Vergleichsuntersuchungen mit Digitoxigenin (**10**), Digoxigenin (12β-Hydroxy-digitoxigenin), Gitoxigenin (16β-Hydroxy-digitoxigenin) und 16α-Gitoxigenin (16α-Hydroxy-digitoxigenin) zeigen, dass die Isomerisierung in wässrig-methanolischer KOH durch Hydroxygruppen in Nachbarschaft zum Lactonring in der Reihenfolge 12β-OH ≪ 16β-OH < 16α-OH beschleunigt wird (Abb 4).

Die Feststellung, dass 16α-OH die Isomerisierung sogar noch stärker als 16β-OH beschleunigt, widerlegt die Annahme von Lingner und Küssner,¹⁴ dass 16β-Hydroxycardenolide infolge der Ausbildung eines spannungsärmeren 16,21-Epoxidrings besonders schnell isomerisieren. Beim 16α-Gitoxigenin kann nämlich aus sterischen Gründen (*trans*-Stellung von 16α-OH zum 17β-ständigen Lactonring) kein 16,21-Epoxid, sondern wie beim Digitoxigenin nur ein 14,21-Epoxid gebildet werden.

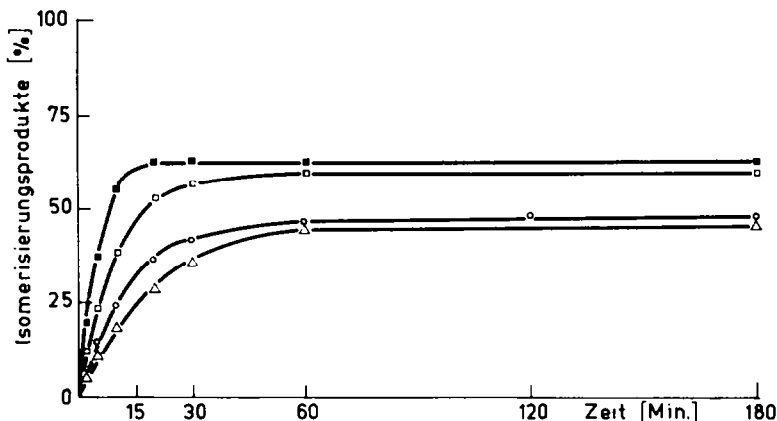


ABB 4. Einfluss zusätzlicher Hydroxygruppen auf die Kinetik der Isomerisierung durch wässrig-methanolische (8:2) 0.5 n KOH bei 20°: *Digitoxigenin* (Δ — Δ), *Digoxigenin* (12 β -Hydroxy-digitoxigenin) (\circ — \circ), *Gitoxigenin* (16 β -Hydroxy-digitoxigenin) (\square — \square), 16 α -*Gitoxigenin* (16 α -Hydroxy-digitoxigenin) (\blacksquare — \blacksquare).

Als Ursache der im Vergleich zu *Digitoxigenin* beschleunigten Isomerisierung von 16 α -*Gitoxigenin*, *Gitoxigenin* und auch *Digoxigenin* ist anzunehmen, dass durch den —I-Effekt einer zusätzlichen Hydroxygruppe die Dissoziationsbereitschaft der C—H-Bindung an C-21 und damit die Bildung des Furylanions als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Isomerisierung begünstigt wird.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte (korr. Werte) wurden mit dem Mikro-Schmelzpunktapparat Boetius (Methode Kofler) und die spezifischen Drehungen mit dem Kreispolarmeter von Schmidt und Haensch oder dem Spectralpolarimeter 141 M (Perkin-Elmer) bestimmt. Die IR-Absorptionsspektren wurden in KBr mit einem UR 10 (VEB Carl Zeiss, Jena) und die Massenspektren mit dem Massenspektrometer MS 902 S (AEI, Manchester) aufgenommen.

Verteilungschromatographie absteigend an Formamid-impregniertem Papier (Schleicher & Schüll 2043 bMgl) mit den von Kaiser^{15,16} angegebenen Fließmitteln und Dünnschichtchromatographie aufsteigend bei Kammer sättigung auf 0.25 mm Kieselgel G (Merck), aktiviert bei 105°. Zur Sichtbarmachung der Substanzflecke diente Trichloressigsäure/Chloramin¹⁵ oder Antimontrichlorid¹⁷. Präparative Schichtchromatographie aufsteigend auf PSC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ (Merck) und Säulenchromatographie nach der Durchlaufmethode an Kieselgel 0.05–0.2 mm (Merck) oder Kieselgel H (Merck).

17 α -*Digitoxigenin* (1)

Das in Anlehnung an Frèrejacque¹⁸ hergestellte Präparat war chromatographisch einheitlich und hatte einen Schmp. von 172–173° (nach Frèrejacque¹⁹ liegt der Schmp. des mit 1 identischen Menabegenins* bei 190–192°). IR-Spektrum: 1182 cm⁻¹ (C—O—C), 1628 cm⁻¹ (C=C konj.), 1750 u. 1783 cm⁻¹ (C=O konj.-ungesätt. γ -Lacton).

3 β ,14,21 ξ -*Trihydroxy*-5 β ,14 β ,17 α ,20 ξ -*cardanolid* (4a u. 4b)

200 mg 1 wurden in 15 ml methanolischer 0.5 n KOH gelöst und 90 Min. auf 50° erwärmt. Nach Zusatz von 15 ml Wasser wurde die Lösung zur Entfernung des Methanols am Vakuum-Rotationsverdampfer auf etwa 10 ml eingengt. Nach schwachem Ansäuern mit Essigsäure kristallisierten 166 mg Isomerisierungsprodukt aus. Der Chloroform-Auszug der Mutterlauge lieferte weitere 39 mg. Da nach der dünn-schichtchromatographischen Analyse sowohl Kristallfraktion als auch Mutterlauge neben sehr wenig nicht umgesetztem 1 ein Gemisch von 4a und 4b enthielten, wurden sie vereinigt und an 50 g Kieselgel H (Kurz-

* Eine authentische Probe verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Prof. T. Reichstein, Basel.

säule, 18,5 cm Füllhöhe) chromatographiert. Elution mit Essigester-Äthanol (95:5) in 10 ml-Fractionen lieferte 56 mg chromatographisch reines **4a** (Fractionen 15–17) und 151 mg eines Gemisches von **4a** und **4b** (Fractionen 18–192). **4a** schmolz nach Umkristallisieren aus Äthanol-Essigester zwischen 204–233° (Zers.). $[\alpha]_D^{20} + 24,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,334$, in Äthanol): IR-Spektrum: 933 cm^{-1} (—O—CH—O—), 1742 cm^{-1} (C=O gesätt. γ -Lacton): Massenspektrum (versuchsweise Zuordnung): 392 = M^+ , 374 = $M^+ \cdot H_2O$, 359 = 374- CH_3 , 356 = 374- H_2O , 341 = 356- CH_3 , 338 = 356- H_2O , 323 = 338- CH_3 , 302 = 356- C_4H_6 ,²⁰ 284 = 302- H_2O , 273 = 374- $C_4H_5O_3$ (Lactonseitenkette), 272 = 374- $C_4H_6O_3$, 257 = 272- CH_3 , 255 = 273- H_2O , 254 = 272- H_2O , 239 = 257- H_2O , 203 = $C_{15}H_{23}^+$.²⁰

2,4-Dinitrophenylhydrazon der mit **4** im Gleichgewicht stehenden γ -Aldehyd-carbonsäure **3**

Verbindung **4a** lieferte mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin beim Kochen mit Eisessig in Äthanol ein Gemisch zweier 2,4-Dinitrophenylhydrazone, die durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel mit Essigester-Äthanol (95:5) getrennt werden konnten. Das rascher wandernde Isomere kristallisierte aus Dioxan-Wasser in gelben Nadeln vom Schmp. 241–243°. ($C_{29}H_{40}O_8N_4$ (572-664) Ber: C, 60-83; H, 7-04; N, 9-78. Gef: C, 60-99; H, 7-12; N, 9-43%). Das langsamere wandernde Isomere kristallisierte aus Dioxan-Wasser in gelben Nadeln vom Schmp. 187–191°. ($C_{29}H_{40}O_8N_4$ (572-664) Ber: C, 60-83; H, 7-04; N, 9-78. Gef: C, 60-97; H, 7-07; N, 9-80%).

3 β ,14-Dihydroxy-21 ξ -methoxy-5 β ,14 β ,17 α ,20 ξ -cardanolid (**5a–5c**)

(a) Aus 3 β ,14,21 ξ -Trihydroxy-5 β ,14 β ,17 α ,20 ξ -cardanolid (**4**). Eine Lösung von 200 mg eines Gemisches von **4a** und **4b** in 5 ml Methanol wurde unter Eiskühlung mit einem geringen Überschuss ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach 20 Min. wurden das überschüssige Diazomethan und das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen. Das Gemisch der isomeren Methoxylactone wurde an 20 g Kieselgel H (Kurzsäule, 21 cm Füllhöhe) chromatographiert. Elution mit Methylenchlorid-Äthanol (99:5:0,5, 99:1 und 97:5:2,5) lieferte neben Mischfraktionen 39 mg des am raschesten wandernden Isomeren **5a**, 46 mg des in der Mitte wandernden Isomeren **5b** und 84 mg des am langsamsten wandernden Isomeren **5c** in dünn-schichtchromatographisch reiner Form. **5a** kristallisierte aus Aceton-Hexan in Nadeln, die ab 152° unter Zersetzung schmolzen. $[\alpha]_D^{23} - 24,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,479$, in Methanol): IR-Spektrum: 924 cm^{-1} (—O—CH—O—), 1773 cm^{-1} (gesätt. γ -Lacton): Massenspektrum (versuchsweise Zuordnung): 406 = M^+ , 388 = $M^+ \cdot H_2O$, 373 = 388- CH_3 , 371 = 388-OH, 370 = 388- H_2O , 355 = 370- CH_3 , 339 = 370- CH_3O , 300 (?), 290 = $M^+ \cdot C_5H_8O_3$ (Lacton), 272 = 290- H_2O , 203 = $C_{15}H_{23}^+$.²⁰ ($C_{24}H_{38}O_5$ (406-568) Ber: C, 70-91; H, 9-42. Gef: C, 70-92; H, 9-57%). **5b** kristallisierte aus Aceton-Hexan in Nadeln, die ab 165° unter Zersetzung schmolzen. $[\alpha]_D^{23} + 23,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,500$, in Methanol): IR-Spektrum: 920 cm^{-1} (—O—CH—O—), 1768 cm^{-1} (C=O gesätt. γ -Lacton): Massenspektrum (versuchsweise Zuordnung): 406 = M^+ , 388 = $M^+ \cdot H_2O$, 373 = 388- CH_3 , 371 = 388-OH, 370 = 388- H_2O , 355 = 370- CH_3 , 339 = 370- CH_3O , 300 (?), 290 = $M^+ \cdot C_5H_8O_3$ (Lacton), 272 = 290- H_2O , 203 = $C_{15}H_{23}^+$.²⁰ ($C_{24}H_{38}O_5$ (406-568) Ber: C, 70-91; H, 9-42. Gef: C, 70-86; H, 9-39%). **5c** war dünn-schichtchromatographisch einheitlich, konnte jedoch nicht zur Kristallisation gebracht werden. $[\alpha]_D^{20} - 26,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,507$, in Methanol): IR-Spektrum: 949 cm^{-1} (—O—CH—O—), 1787 cm^{-1} (C=O gesätt. γ -Lacton): Massenspektrum (versuchsweise Zuordnung): 406 = M^+ , 388 = $M^+ \cdot H_2O$, 374 = $M^+ \cdot CH_3OH$, 370 = 388- H_2O , 356 = 388- CH_3OH , 339 = 370- CH_3O , 300 (?), 290 = $M^+ \cdot C_5H_8O_3$ (Lacton), 272 = 290- H_2O , 203 = $C_{15}H_{23}^+$.²⁰ $C_{24}H_{38}O_5$ Ber: Mol.-Gew. 406-2721 Gef: *m/e* 406-2719.

(b) Aus 17 α -Digitoxigenin (**1**). 5 mg **1** wurden in 0,25 ml methanolischer 0,5 n KOH gelöst. Nach 3 Min. wurden Proben von 5 μ l (entsprechend 100 γ eingesetztem **1**) entnommen und direkt auf Dünn-schichtplatten aufgetragen. Nach dem Entwickeln der Chromatogramme mit Essigester-Äthanol (95:5) bzw. Methylenchlorid-Äthanol (98:2) wurde durch Vergleich mit authentischen Substanzen, die nach (a) hergestellt waren, die Bildung der drei isomeren Methoxylactone **5a–5c** nachgewiesen.

3 β ,21 ξ -Diacetoxy-14-hydroxy-5 β ,14 β ,17 α ,20 ξ -cardanolid (**6a u. 6b**)

Ein Gemisch von **4a** und **4b** (200 mg) wurde in Pyridin mit Acetanhydrid acetyliert. Das erhaltene Gemisch der Isomeren **6a** und **6b** wurde an 20 g Kieselgel H (Kurzsäule, Füllhöhe 21,5 cm) chromatographiert. Elution mit Methylenchlorid-Äthanol (99:5:0,5 bzw. 99:1) lieferte neben Mischfraktionen 42 mg des rascher wandernden Isomeren **6a** und 56,5 mg des langsamer wandernden Isomeren **6b**.

Verbindung **6a** kristallisierte aus Aceton-Hexan in Form glänzender Nadeln vom Schmp. 222–225°: $[\alpha]_D^{23} + 24,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,500$, in Methanol): IR-Spektrum: 970 cm^{-1} (—O—CH—O—), 1238, 1261 cm^{-1} (C—O—C Acetat), 1744, 1761 cm^{-1} (C=O Acetat), 1804 cm^{-1} (C=O γ -substituiertes gesätt. γ -Lacton): Massenspektrum (versuchsweise Zuordnung): 458 = $M^+ \cdot H_2O$, 416 = $M^+ \cdot CH_3COOH$, 398 = 416- H_2O , 383 = 398- CH_3 , 356 = 416- CH_3COOH , 341 = 356- CH_3 , 338 = 356- H_2O , 323 = 338-

CH₃, 315 = 458-C₆H₇O₄ (Lactonseitenkette), 314 = 458-C₆H₈O₄, 254 = 314-CH₃COOH, 239 = 254-CH₃, 203 = C₁₅H₂₃⁺²⁰ (C₂₇H₄₀O₇ (476·616) Ber: C, 68·04; H, 8·46. Gef: C, 67·84; H, 8·41 %).

Verbindung **6b** kristallisierte aus Äthanol in Tetradern vom Schmp. 260–262° und aus Aceton-Hexan in Nadeln vom Schmp. 184–186: $[\alpha]_D^{25} - 27·6 \pm 2^\circ$ (c = 0·500, in Methanol): IR-Spektrum: 1020 cm⁻¹ (—O—CH—O—), 1241, 1262 cm⁻¹ (C—O—C Acetat), 1723, 1749 cm⁻¹ (C=O Acetat), 1795 cm⁻¹ (C=O γ -substituiertes gesätt. γ -Lacton): Massenspektrum (versuchsweise Zuordnung): 472 (?), 458 = M⁺-H₂O, 416 = M⁺-CH₃COOH, 398 = 416-H₂O, 383 = 398-H₂O, 356 = 416-CH₃COOH, 341 = 356-CH₃, 338 = 356-H₂O, 323 = 338-CH₃, 315 = 458-C₆H₇O₄ (Lactonseitenkette), 314 = 458-C₆H₈O₄, 254 = 314-CH₃COOH, 239 = 254-CH₃, 203 = C₁₅H₂₃⁺²⁰ (C₂₇H₄₀O₇ (476·616) Ber: C, 68·04; H, 8·46. Gef: C, 68·07; H, 8·45%).

3 β ,21-Dihydroxy-14,21 ξ -epoxy-24-nor-5 β ,14 β ,20 ξ -cholan-23-säure (**16**)

(a) Aus *Digitoxigenin* (**10**) über **15**. In Anlehnung an die Vorschrift von Jacobs und Gustus⁴ wurden 60 mg **15** vom Schmp. 268–269·5° (dargestellt durch Einwirkung von methanolischer 0·5 n KOH auf **10** nach Lit.⁴) in 6 ml wässrig-methanolischer 0·5 n KOH auf 70° erhitzt, bis vollständige Lösung eingetreten war. Beim Ansäuern mit verdünnter Essigsäure auf p_H 6 kristallisierte **16** in Nadeln, die sich bei 205° zu flachen Nadeln umwandelten und bei 242–247° schmolzen, Ausbeute 33 mg. IR-Spektrum: 1702 cm⁻¹ (C=O gesätt. Carbonsäure).

(b) Aus *Digitoxigenin* (**10**) über **11**. Eine Lösung von 10 mg **10** in 0·5 ml Pyridin und 10 ml wässriger 0·5 n KOH wurde 2·5 Stdn. bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Verseifung zu **11** stehen gelassen. Nach Zusatz von 40 ml methanolischer 0·5 n KOH wurde 25 Stdn. auf 40° erwärmt. Durch papierchromatographischen Vergleich (Fließmittel: Diisopropyläther-Methyläthylketon (3:2)) der Reaktionsprodukte mit authentischen Substanzen wurde die Bildung von **16** nachgewiesen.

16 α -Gitoxigenin

Das nach einem früher angegebenen Verfahren²¹ hergestellte Präparat war chromatographisch einheitlich und hatte einen Schmp. von 210–215° (teilweise) und 235–235·5° (Lit.²² 212–214°).

Kinetik der basenkatalysierten Isomerisierung

Die Ausführung der kinetischen Versuche sei an zwei Beispielen skizziert:

(a) *Isomerisierung von 1 in methanolischer 0·5 n KOH bei 20°*. In einer Reihe identischer Ansätze wurden je (= 0·1 μ Mol) **1** in 50 μ l Pyridin mit 5·0 ml methanolischer 0·5 n KOH versetzt und bei 20·0 \pm 0·1° im Thermostaten gehalten. Nach den in Abb. 2 angegebenen Zeiten wurde die Isomerisierung durch Zusatz von 1 ml Eisessig abgebrochen. Nach 30 Min. Stehen wurden die angesäuerten Proben mit 5 ml Wasser versetzt und mit zweimal 10 ml Chloroform extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. wurde im Rückstand mit der Pikrinsäure-Reaktion²³ die Menge des nichtisomeren Cardenolids quantitativ bestimmt, die sich aus der Summe des nichtumgesetzten und des durch Relactonisierung der α,β -ungesättigten γ -Hydroxy-carbonsäure **2** zurückerhaltenen **1** zusammensetzt. Der als Differenz zum eingesetzten Genin sich ergebende nichtrelactonisierbare Anteil entspricht der Menge der gebildeten Isomerisierungsprodukte. Die Abweichung der Doppelbestimmungen vom Mittelwert betrug weniger als 2%.

(b) *Isomerisierung von 2 in wässrig-methanolischer (8:2) 0·5 n KOH bei 20°*. Eine Lösung von 1·5 mg (= 4 \times 10⁻⁶ Mol) **1** in 2 ml Pyridin wurde mit wässriger 0·5 n KOH auf 200 ml aufgefüllt und zur quantitativen Lactonringverseifung 2·5 Std. bei 20° im Thermostaten gehalten. Danach wurde der zu **1** relactonisierbare Anteil bestimmt, welcher der Menge von **2** entspricht. Dem Ansatz wurden Proben von je 5 ml (= 0·1 μ Mol) entnommen, mit 1·25 ml methanolischer 0·5 n KOH versetzt und bei 20·0 \pm 0·1° im Thermostaten gehalten. Nach den in Abb. 2 angegebenen Zeiten wurde die Isomerisierung durch Zusatz von 1 ml Eisessig abgebrochen. Aufarbeitung und quantitative Bestimmung der Proben wie unter (a) beschrieben.

Fräulein H. Galle hat durch sorgfältige Durchführung der Experimente entscheidend zum Gelingen dieser Untersuchungen beigetragen.

Für die Aufnahme der Massenspektren danken wir Herrn Dr. P. Franke und für die Aufnahme und Diskussion der IR-Spektren Frau Dr. I. Wendel.

LITERATUR

¹ C. Lindig und K. R. H. Repke, *Acta Biol. Med. Germ.* **26**, 501 (1971)

² W. A. Jacobs und A. M. Collins, *J. Biol. Chem.* **61**, 387 (1924)

- ³ W. A. Jacobs und E. L. Gustus, *Ibid.* **74**, 811 (1927)
- ⁴ W. A. Jacobs und E. L. Gustus, *Ibid.* **78**, 573 (1928)
- ⁵ W. D. Paist, E. R. Plout, F. C. Uhle und R. C. Elderfield, *J. Org. Chem.* **6**, 273 (1941)
- ⁶ G. K. Makaritschew und N. K. Abubakirow, *Khim. Prirod. Soed.* **92** (1968)
- ⁷ G. K. Makaritschew und N. K. Abubakirow, *Dokl. Akad. Nauk.SSSR* **180**, 1112 (1968)
- ⁸ C. Lindig und K. R. H. Repke, *Mber. Dt. Akad. Wiss.* **5**, 237 (1963)
- ⁹ C. Lindig und K. R. H. Repke, *Tetrahedron* **28**, 1859 (1972)
- ¹⁰ IUPAC-IUB, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**, 663 (1970)
- ¹¹ W. A. Jacobs, A. Hoffman und E. L. Gustus, *J. Biol. Chem.* **70**, 1 (1926)
- ¹² R. N. Jones und B. S. Gallagher, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5242 (1959)
- ¹³ A. Kuritzkes, J. v. Euw und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **42**, 1502 (1959)
- ¹⁴ K. Lingner und W. Küssner, *Arzneim.-Forsch.* **12**, 835 (1962)
- ¹⁵ F. Kaiser, *Chem. Ber.* **88**, 556 (1955)
- ¹⁶ F. Kaiser, E. Haack und H. Spingler, *Liebigs Ann.* **603**, 75 (1957)
- ¹⁷ D. Lawday, *Nature, Lond* **170**, 415 (1952)
- ¹⁸ M. Frèrejacque, *C.R. hebd. Séances Acad. Sci.* **248**, 3027 (1959)
- ¹⁹ M. Frèrejacque, *Ibid.* **248**, 2382 (1959)
- ²⁰ M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Massenspektren von Steroiden*, in *Fortschr. Chem. Forsch.* **12**, 440-537, bes. S. 485, 491-493 und 516, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)
- ²¹ C. Lindig und K. Repke, Deutsches Wirtschaftspatent 67424 v. 5.12.1967
- ²² J. H. Russel, O. Schindler und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **43**, 167 (1960)
- ²³ F. Neuwald, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.* **39**, 172 (1950)