

## MECHANISMUS DER BASENKATALYSIERTEN REAKTIONEN VON CARDENOLIDEN—II EINFLUSS DER TEMPERATUR\*

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**—Digitoxigenin (1) und 17 $\alpha$ -Digitoxigenin (3) liefern beim Erhitzen in wässriger KOH neben bekannten Produkten die 3 $\beta$ ,14,21-Trihydroxy-24-nor-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -chol-17(20)-en-23-säure (5), welche beim Ansäuern zum 3 $\beta$ ,14-Dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -card-17(20)-enolid (2) lactonisiert. Die Reaktion verläuft über die isomeren  $\Delta^{20(22)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäuren 4 und 6. Erhitzen von 1 in Dimethylformamid in Gegenwart von Na-Tosylat unter Feuchtigkeitsausschluss ergibt neben Spuren von 2 hauptsächlich 3. Unter gleichen Bedingungen wird 2 vorzugsweise zu 3 aber auch 1 umgelagert. Diese Umlagerungen erfolgen ohne Öffnung des Lactonrings. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die Reaktionsmechanismen diskutiert, die in Abhängigkeit vom Lösungsmittel differieren.

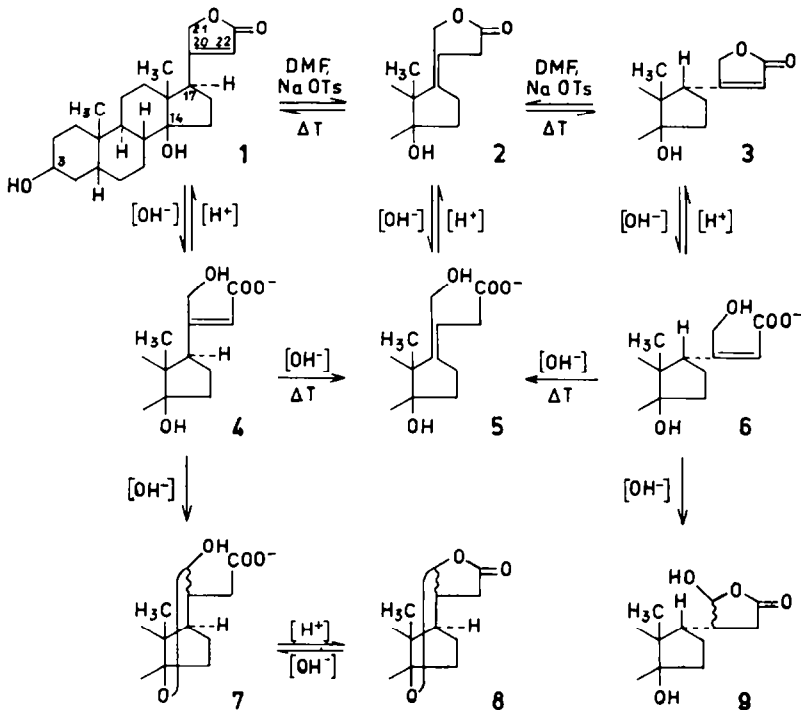
**Abstract**—The base-catalysed transformations of digitoxigenin (1) and 17 $\alpha$ -digitoxigenin (3) at elevated temperatures have been investigated. These compounds, on heating in aqueous KOH, yield besides known products the 3 $\beta$ ,14,21-trihydroxy-24-nor-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -chol-17(20)-en-23-acid (5) which on acidification lactonizes to the 3 $\beta$ ,14-dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -card-17(20)-enolid (2). The reactions proceed through the isomeric  $\Delta^{20(22)}$ - $\gamma$ -hydroxy carbonic acids 4 and 6. Heating of 1 in dimethyl formamide in presence of Na-tosylate excluding moisture gives principally 3, but traces of 2 are also found. Treatment of 2 under comparable conditions yields mainly 3 besides traces of 1. These rearrangements take place without saponification of the lactones. The results are discussed in respect of the reaction mechanism differing in dependence of the solvent used.

Wie in der vorangehenden Arbeit<sup>1</sup> gezeigt ist, führt die Baseneinwirkung auf Cardenolide bei Raumtemperatur über unterschiedliche, vom Lösungsmittel abhängige Reaktionswege zu denselben Isomerisierungsprodukten: aus 17 $\alpha$ -Cardenoliden wie 17 $\alpha$ -Digitoxigenin (3) entstehen als cyclische Halbacylate der  $\gamma$ -Aldehyd-carbonsäuren die 21-Hydroxy-17 $\alpha$ -cardanolide (9); aus 17 $\beta$ -Cardenoliden wie Digitoxigenin (1) oder Gitoxigenin entstehen die 14,21- (8) bzw. 16,21-Epoxycardanolide. Während in wässriger Lösung die primäre Hydrolyse des Lactonrings unter Bildung der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten  $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäuren und die anschließende Verlagerung der Doppelbindung unter Bildung der  $\gamma$ -Aldehyd-carbonsäuren bevorzugt wird, erfolgt in alkoholischer Lösung die Isomerisierung vorzugsweise ohne vorangehende Öffnung des Lactonrings über das Furylanion. Gegenstand der vorliegenden Mitteilung sind Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf den Mechanismus der basenkatalysierten Reaktionen von Cardenoliden, über den wir bisher nur sehr kurz berichtet haben.<sup>2</sup>

Bei Einwirkung von wässriger KOH auf Digitoxigenin (1) führt eine Erhöhung

\* 24. Mitteilung über Untersuchungen an herzwirksamen Steroiden: 23. Mitteilung.<sup>1</sup>

der Temperatur nicht nur zu einer Erhöhung der Verseifungsgeschwindigkeit, sondern zugleich zu einer Erhöhung der Isomerisierungsgeschwindigkeit von **1** sowie von intermediär gebildeter 3 $\beta$ ,14,21-Trihydroxy-24-nor-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -chol-20(22)-en-23-säure (**4**). Darüber hinaus zeigt die chromatographische Analyse der Reaktionsprodukte, dass oberhalb 50° weitere Umsetzungen stattfinden. Das Hauptprodukt der Umsetzung in wässriger 0.1 n KOH bei 80° ist die bereits von Jacobs und Gustus<sup>3</sup> beschriebene 3 $\beta$ ,14-Dihydroxy-21-oxo-24-nor-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,20 $\xi$ -cholan-23-säure (= "Isodigitoxigeninsäure"<sup>3</sup>), die in ihrer Cyclohalbacetalform als 3 $\beta$ ,21-Dihydroxy-14,21 $\xi$ -epoxy-24-nor-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,20 $\xi$ -cholan-23-säure (**7**) vorliegen dürfte, denn das IR-Spektrum zeigt keine Absorption zwischen 1720–1740 cm<sup>-1</sup>. Beim Ansäuern des Reaktionsgemisches auf pH 6 erhält man neben **1** (durch Relactonisierung von **4**) und **7** sowie Spuren der beiden isomeren 3 $\beta$ ,14,21 $\xi$ -Trihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\xi$ -cardanolide (**9**)<sup>1</sup> die bisher unbekannte Säure **5**, die als 3 $\beta$ ,14,21-Trihydroxy-24-nor-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -chol-17(20)-en-23-säure (= " $\Delta^{17(20)}$ -Digitoxigeninsäure") identifiziert wurde. **5** ist unter



diesen Bedingungen bereits teilweise zum 3 $\beta$ ,14-Dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -card-17(20)-enolid (**2**) lactonisiert. Bei stärkerem Ansäuern werden aus den Säuren **7** und **5** in zunehmendem Masse das bereits bekannte 3 $\beta$ -Hydroxy-14,21 $\xi$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,20 $\xi$ -cardanolid (**8**)<sup>3-5</sup> bzw. das neue Lacton **2** gebildet. Lacton **2** wird unter Einwirkung von 0.1 n KOH reversibel zur Säure **5** verseift. Bereits bei pH 6 tritt Rückwandlung zu **2** ein: die Relactonisierung von **5** erfolgt also, ähnlich wie bei **4**, ausserordentlich leicht.

Einen Hinweis auf die Konstitution der beiden neuen Verbindungen liefert die Farbreaktion mit Trichloressigsäure/“Chloramin”,<sup>6</sup> die nach Russel *et al.*<sup>7</sup> zur orientierenden Differenzierung zwischen  $17\alpha$ - und  $17\beta$ -Cardenoliden benutzt werden kann, wenn diese an C-12 bzw. C-16 keine OH-Gruppen tragen. Sowohl Lacton **2** als auch Säure **5** geben im Gegensatz zum gelb fluoreszierenden **1** blassblau fluoreszierende Flecke auf dem Papierchromatogramm, was für eine Änderung der Konfiguration an C-17 spricht. Eine Identität zwischen Lacton **2** und  $17\alpha$ -Digitoxigenin (**3**)\* ist jedoch schon auf Grund der unterschiedlichen UV-Spektren (Abb 1) ausgeschlossen. Aus 3

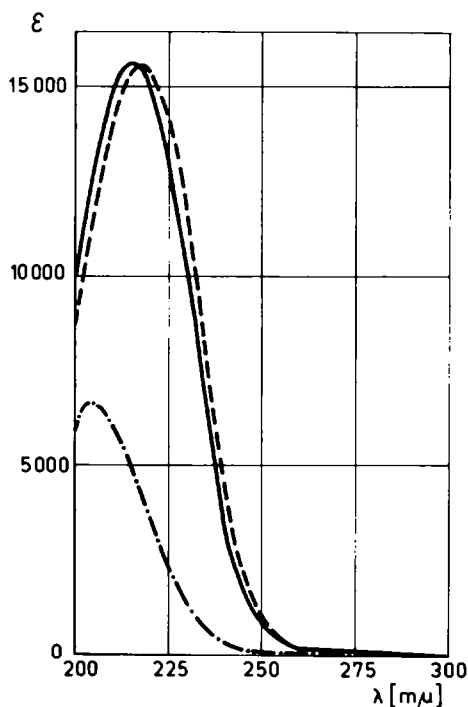


ABB 1. UV-Absorptionsspektren. Digitoxigenin **1** (—), 3 $\beta$ ,14-Dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -card-17(20)-enolid **2** (---), 17 $\alpha$ -Digitoxigenin **3** (----), dargestellt aus **2**

wird aber nach Einwirkung von wässriger 0,5 n KOH bei 80° und Ansäuern neben den beiden stereoisomeren 21-Hydroxy-17 $\alpha$ -cardanoliden **9**<sup>1</sup> dasselbe Lacton **2** erhalten, welches bei der Umsetzung von **1** unter gleichen Bedingungen entsteht. Das gleiche Lacton **2** entsteht auch nach vollständiger Verseifung von **1** oder **3** (wässrige KOH bei 20°) zu den entsprechenden  $\alpha,\beta$ -ungesättigten  $\gamma$ -Hydroxycarbonsäuren (**4** bzw. **6**) durch anschließendes 1-stündiges Erhitzen auf 80° und Lactonisierung der gebildeten Säure **5**. Werden die Cardenolide **1** bzw. **3** dagegen mit methanolischer KOH bei 20° umgesetzt, dann kann **2** durch anschließendes Erhitzen der alkalischen Lösungen und Ansäuern nicht mehr erhalten werden.

\* Unter Einwirkung schwacher Basen in Dimethylformamid unter Feuchtigkeitsausschluss wurden aus Digitoxigenin (**1**) und einer Reihe weiterer Aglykone 17 $\alpha$ -Cardenolide erhalten.<sup>7-10</sup>

Die Bildung von Lacton **2** sowohl aus **1** als auch **3** sowie aus den entsprechenden  $\alpha,\beta$ -ungesättigten  $\gamma$ -Hydroxycarbonsäuren (**4** bzw. **6**) zwingt zu dem Schluss, dass die Baseneinwirkung zur Aufhebung der Asymmetrie an C-17 geführt haben muss. Die Aufhebung der Asymmetrie ist aber nur durch die Verlagerung der Doppelbindung von 20(22)- nach 17(20)-Stellung möglich.\*

Die für **2** angenommene Struktur wird durch das IR-Spektrum weiter bestätigt. Die für Butenolide typische Aufspaltung der Carbonylbande<sup>11</sup> sowie die Absorptionsbande für die konjugierte C=C-Bindung sind verschwunden. Die Carbonylfrequenz ist nach kürzeren Wellenlängen verschoben und liegt mit  $1773\text{ cm}^{-1}$  in dem für gesättigte  $\gamma$ -Lactone angegebenen Bereich von  $1770\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ <sup>12</sup>.

Die Lage der C=C-Bindung in 17(20)-Stellung und damit die Konstitution von **2** wurde schliesslich eindeutig durch Ozonolyse<sup>13</sup> von **2** bewiesen. Auf Grund unbefriedigender Vorversuche wurde zur Ausschaltung von Nebenreaktionen anstelle des von Meyer und Reichstein<sup>13</sup> empfohlenen Essigsäureäthylesters als Lösungsmittel Methanol verwendet, welches das als Zwischenstufe zu vermutende Zwitterion als Hydroperoxyather abfangen und damit eine Polymerisation des Zwitterions weitgehend verhindern kann. Als Hauptprodukt der Ozonolyse wurde  $3\beta,14$ -Dihydroxy- $5\beta,14\beta$ -androstano-17-on (**10**) identifiziert. Ein Vergleich seines IR-Spektrums mit dem des Desacylierungsproduktes von  $3\beta$ -Acetoxy-14-hydroxy- $5\beta,14\beta$ -androstano-17-on (**11**), das nach Danieli *et al.*<sup>14</sup> dargestellt wurde, ergibt Identität. Die Carbonylbande von **10** liegt, in Chloroform gemessen, mit  $1737\text{ cm}^{-1}$  innerhalb des von Jones und Herling<sup>11</sup> für 17-Ketosteroide angegebenen charakteristischen Bereichs von  $1733\text{--}1737\text{ cm}^{-1}$ .

Zur Klärung des Bildungsmechanismus der  $3\beta,14,21$ -Trihydroxy-24-nor- $5\beta,14\beta$ -chol-17(20)-en-23-säure (**5**) wurde die Kinetik der Bildung der  $\Delta^{17(20)}$ - $\gamma$ -Hydroxycarbonsäure aus Digitoxin sowie aus  $\Delta^{20(22)}$ -Digitoxinsäure in wässriger 0.5 n KOH bei  $80^\circ$  quantitativ untersucht.† Wie aus Abb 2 hervorgeht, sind Geschwindigkeit und

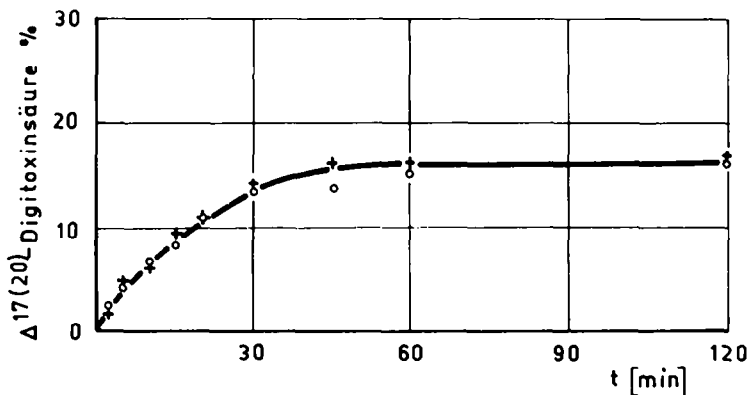


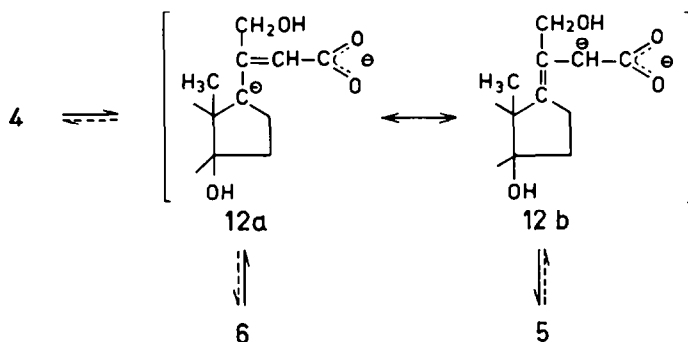
ABB 2. Kinetik der basenkatalysierten Bildung von  $\Delta^{17(20)}$ -Digitoxinsäure aus Digitoxin (+ — +) oder  $\Delta^{20(22)}$ -Digitoxinsäure (O — O) in wässriger 0.5 n KOH bei  $80^\circ$

\* Für das Auftreten von *cis-trans*-Isomeren gab es keinen Hinweis; offenbar ist die Bildung des einen der beiden möglichen Isomeren sterisch bevorzugt.

† Im Gegensatz zum Digitoxigenin (**1**) erlaubt sein Tridigitoxosid Digitoxin quantitative Bestimmungen mit Hilfe der Xanthidrol-Reaktion<sup>16</sup> unabhängig von Umsetzungen am Butenolidring.

Ausmass der Bildung der  $\Delta^{17(20)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäure bei beiden Ausgangsverbindungen gleich. Untersuchungen zur Kinetik der Lactonringverseifung unter gleichen Bedingungen ergeben, dass die Verseifung spätestens nach 1 Min. abgeschlossen ist. Da die Umlagerung der Doppelbindung in die 17(20)-Stellung dagegen erst nach 60 Min. beendet ist, kann die Verlagerung der Doppelbindung von 20(22) nach 17(20)—wenn überhaupt—nur in ganz untergeordnetem Umfang am Lactonring stattfinden, und muss die Bildung der  $\Delta^{17(20)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäure über die  $\Delta^{20(22)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäure erfolgen.

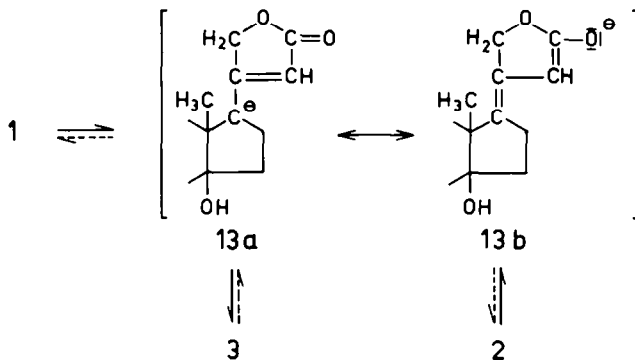
Die gebildete  $\Delta^{17(20)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäure **5** erweist sich bei fortgesetzter Alkalieinwirkung als weitgehend stabil: insbesondere findet eine Umlagerung zu den isomeren  $\Delta^{20(22)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäuren **4** und **6** in messbarem Umfang nicht statt. Dagegen werden **1** und **3**, wie oben beschrieben, über die isomeren  $\Delta^{20(22)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäuren **4** und **6** in die  $\Delta^{17(20)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäure **5** umgelagert. Als gemeinsames hypothetisches Zwischenprodukt ist das mesomere Carbanion **12** anzunehmen, das durch Protonenabspaltung entsteht und durch Kombination mit



einem Proton prinzipiell sowohl in Richtung der beiden an C-17 isomeren  $\Delta^{20(22)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäuren **4** und **6** als auch der  $\Delta^{17(20)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäure **5** reagieren kann. Die Kombination mit einem Proton an C-17 sollte vorwiegend zu dem  $17\alpha$ -Isomeren **6** führen, da bei Steroiden der C/D-cis-Reihe die  $17\alpha$ -Position thermodynamisch begünstigt ist.<sup>17</sup> Ein präparativer Ansatz mit Digitoxigenin (**1**) lieferte jedoch nur Spuren (2%) der früher beschriebenen<sup>1</sup> isomeren 21-Hydroxy- $17\alpha$ -cardanolide **9** als Derivate der  $17\alpha$ -Reihe. Offenbar ist unter den angewandten Bedingungen (wässrige KOH, 80–90°) die  $\Delta^{17(20)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäure **5** thermodynamisch am stabilsten, so dass das Carbanion **12** formal vorzugsweise an C-22 mit einem Proton kombiniert.

Die  $\alpha,\beta$ -Position der C=C-Bindung ist in **12a** nicht durch Konjugation stabilisiert, so dass sich die Doppelbindung relativ leicht in die semicyclische  $\beta,\gamma$ -(17(20))-Position verlagert. Durch  $sp^2$ -Hybridisierung von C-17 nimmt die Pitzer-Spannung für die 17-ständige Seitenkette und die benachbarten Substituenten ab, woraus eine Verminderung des Energieinhalts von Ring D und damit eine Stabilisierung der gebildeten  $\Delta^{17(20)}$ - $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäure **5** resultieren.

Erfolgt die Baseneinwirkung auf **1** bei höherer Temperatur dagegen unter striktem Wasserausschluss in Dimethylformamid und Gegenwart von Na-Tosylat,<sup>8</sup> dann wird die Lactonstruktur beibehalten. Das intermediär gebildete mesomere Anion **13** kombiniert formal vorzugsweise an C-17 mit einem Proton unter Bildung des 17 $\alpha$ -Digitoxigenins (**3**), weil die  $\alpha,\beta$ -Lage der C=C-Bindung durch Konjugation mit der Carbonylgruppe stabilisiert und die 17 $\alpha$ -Position des Lactonrings thermodynamisch begünstigt<sup>17</sup> ist. Daneben konnten wir aber in Spuren auch  $\Delta^{17(20)}$ -Digitoxigenin (**2**) nachweisen, dessen Enolation **13b** Reichstein *et al.*<sup>8</sup> als Intermediärprodukt der Umlagerung **1**  $\rightarrow$  **3** postuliert hatten.



Die supponierte Bildung des mesomeren Anions **13** ist experimentell dadurch bestätigt, dass **2** in Dimethylformamid und Gegenwart von Na-Tosylat sowie Na-Acetat beim Erhitzen auf 125° als Hauptprodukt (74%) **3** liefert, dessen Identität mit authentischem 17 $\alpha$ -Digitoxigenin<sup>9</sup> durch papier- und dünn-schichtchromatographischen Vergleich, Mischschmelzpunkt und UV-Absorptionsspektrum gesichert ist. Neben **3** wurden wenig **1** (1.3%) sowie zwei nicht weiter untersuchte Nebenprodukte erhalten. Die mit der Bildung von **1** und **3** erwiesene Verlagerung der C=C-Bindung von  $\beta,\gamma$ - in  $\alpha,\beta$ -Stellung kann als zusätzlicher Beweis für die 17(20)-Stellung der C=C-Bindung in **2** gewertet werden.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit dem Universal-Spektrophotometer VSU 1 der Firma VEB Carl Zeiss, Jena aufgenommen. Säulenchromatographie nach der Durchlaufmethode an Kieselgel (Merck, Siebfraktion 0.05–0.08 mm) durch Gradientenelution in 5 ml-Fractionen mit den Fließmitteln A = Chloroform-Äthanol (Fließmittelgradient: Frakt. 1–20 0.1% Äthanol/5 ml; Frakt. 21–35 0.2% Äthanol/5 ml; ab Frakt. 36 0.5% Äthanol/5 ml) oder B = Di-n-propyläther-Äthanol (Fließmittelgradient: Frakt. 1–10 0.1% Äthanol/5 ml; Frakt. 11–35 0.2% Äthanol/5 ml; ab Frakt. 36 0.5% Äthanol/5 ml). Weitere allgemeine Angaben vgl. 23. Mitteilung<sup>1</sup>.

#### 3 $\beta$ ,14-Dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -card-17(20)-enolid = $\Delta^{17(20)}$ -Digitoxigenin (**2**)

(a) Aus Digitoxigenin (**1**). Eine Lösung von 250 mg **1** in 5 ml Pyridin wurde mit 100 ml wässriger 0.1 n KOH versetzt und auf 90° erhitzt, wobei das zunächst teilweise ausgefallene **1** innerhalb 30 Min. unter Isomerisierung vollständig in Lösung gegangen war. Nach 3 Std. wurde mit 1 n HCl neutralisiert, zur Lactonisierung der gebildeten  $\Delta^{17(20)}$ -Digitoxigeninsäure (**5**) mit Essigsäure auf pH 4 angesäuert und nach 1 Std. Stehen mit Chloroform extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand

säulenchromatographisch an 12 g Kieselgel getrennt. Gradientenelution mit Fließmittel A lieferte 41 mg nur noch schwach mit **1** verunreinigtes **2**. Erneute Gradientenelution an 12 g Kieselgel mit Fließmittel B ergab reines **2** (30 mg, 12%). Nach Umkristallisieren aus Chloroform–Hexan lag der Schmp. bei 197–217° (Zers.)  $[\alpha]_D^{20} + 13 \pm 2^\circ$  ( $c = 1.00$  in Methanol). UV-Spektrum (Äthanol):  $\lambda_{\max}$  204 nm ( $\log \epsilon = 3.82$ ); IR-Spektrum (KBr): 1180  $\text{cm}^{-1}$  (C—O—C), 1773  $\text{cm}^{-1}$  (ges. Lacton). (C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> (374.525) Ber.: C, 73.76; H, 9.15. Gef.: C, 73.88; H, 9.38%).

(b) Aus *Digitoxigeninsäure* (**4**) oder *17 $\alpha$ -Digitoxigeninsäure* (**6**). Eine Lösung von  $6 \times 10^{-7}$  Mol **1** bzw. **3** in 0.2 ml Pyridin und 20 ml wässriger 0.5 n KOH wurde zur vollständigen Verseifung 1 Std. bei 20° gehalten. Je 5 ml der alkalischen Lösungen wurden mit Chloroform extrahiert; die Extrakte enthielten kein unverseiftes Genin. Weitere 5 ml jeder Lösung wurden mit 1 ml Eisessig angesäuert und lieferten die eingesetzten Gene nahezu quantitativ zurück. Der Rest von je 10 ml (entsprechend  $3 \times 10^{-7}$  Mol) wurde 1 Std. auf 90° im Thermostaten erhitzt, im Eisbad abgekühlt, mit 1 ml Eisessig angesäuert und nach 30 Min. Stehen mit Chloroform extrahiert. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Chloroformextrakte unter Vergleich mit authentischem **2** ergab neben den 14,21-Epoxy-Verbindungen (aus **4**) bzw. 21-Hydroxy-17 $\alpha$ -cardanoliden (aus **6**) die Bildung von **2**. Die gleichen Reaktionsprodukte wurden bei der Einwirkung von wässriger 0.5 n KOH auf **1** bzw. **3** bei 90° auch ohne vorangehende Verseifung bei 20° zu den  $\alpha,\beta$ -ungesättigten  $\gamma$ -Hydroxy-carbonsäuren **4** und **6** erhalten.

(c) Aus *Digitoxigenin* (**1**) unter Wasserausschluss. In Anlehnung an die Vorschrift von Kuritzkes *et al.*<sup>8</sup> wurde eine Lösung von 200 mg **1** in 6 ml Dimethylformamid in Gegenwart von je 100 mg Na-Tosylat und Na-Acetat im zugeschmolzenen Rohr 30 Std. auf 125° erhitzt. Nach säulenchromatographischer Anreicherung durch Chromatographie an 8 g Kieselgel. Gradientenelution mit Fließmittel B (Fließmittelgradient 0.2% Äthanol/5 ml), wurde das neben **3** in Spuren gebildete **2** durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authentischem Material identifiziert.

#### 3 $\beta$ ,14,21 $\xi$ -Trihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\xi$ -cardanolid (**9**) aus **1**

Analog zur vorstehend unter (a) beschriebenen Darstellung von **2** wurde eine Lösung von 200 mg **1** in 4 ml Pyridin mit 80 ml wässriger 0.1 n KOH 3 Std. auf 90° erhitzt. Nach Aufarbeitung des Ansatzes wurde der Rückstand des Chloroform-Extrakts an 20 g Kieselgel H (Kurzsäule, 21 cm Füllhöhe) chromatographiert. Elution mit Essigester-Äthanol-(98:2) lieferte 7 mg eines Gemisches der isomeren 21-Hydroxy-17 $\alpha$ -cardanolide **9**, das noch zwei nicht weiter untersuchte Nebenprodukte enthielt. Die schichtchromatographische Auftrennung an Kieselgel G mit Chloroform-Äthanol-(94:6) ergab neben 4.5 mg wenig verunreinigtem Isomerengemisch 1 mg chromatographisch reines Gemisch der Isomeren **9**. Der Identitätsbeweis erfolgte nach Acetylierung oder Methylierung mit Diazomethan von jeweils 250  $\gamma$  Isomerengemisch durch dünnschichtchromatographischen Vergleich der gebildeten 3 $\beta$ ,21 $\xi$ -Diacetoxy-14-hydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\xi$ -cardanolide bzw. 3 $\beta$ ,14-Dihydroxy-21 $\xi$ -methoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\xi$ -cardanolide mit authentischen Substanzen.<sup>1</sup>

#### *Digitoxigenin* (**1**) bzw. 17 $\alpha$ -*Digitoxigenin* (**3**) aus **2**

Eine Lösung von 5 mg **2** in 5 ml frischdestilliertem Dimethylformamid wurde nach Zusatz von je 10 mg wasserfreiem Na-Tosylat und Na-Acetat im zugeschmolzenen Rohr 30 Min. auf 125° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 10 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel i.Vak. abgezogen. Dünnschichtchromatographische Untersuchung des Rückstands ergab vollständige Umsetzung des eingesetzten **2**. Quantitative Bestimmung mit der Pikrinsäure-Reaktion<sup>15</sup> nach papierchromatographischer Auftrennung des Reaktionsgemisches mit Isopropyläther–Methyläthylketon (3:2, Formamid ges.) ergab 1.3% **1** und 74% **3** bezogen auf eingesetztes **2**. Nach Entnahme der Proben wurde die Hauptmenge an 10 g Kieselgel durch Gradientenelution mit Fließmittel B chromatographiert. Die Fraktionen 39–44 hinterliessen nach Abziehen des Lösungsmittels i.Vak. 3 mg reines **3**. Nach Umkristallisieren aus Essigester-Äther wurden 0.8 mg Nadeln vom Schmp. 169–173° erhalten. Misch-Schmp. mit authentischer Substanz 168–173°. UV-Spektrum (Äthanol):  $\lambda_{\max}$  217 nm ( $\log \epsilon = 4.19$ ).

#### 3 $\beta$ ,14-Dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -androstan-17-on (**10**)

(a) Aus  $\Delta^{17(20)}$ -*Digitoxigenin* (**2**). Eine Lösung von 22 mg **2** in 5 ml absolutem Methanol wurde auf –80° abgekühlt. Durch die Lösung wurde während 2 Min. trockner ozonhaltiger Sauerstoff (ca 20 l/Std. mit ca 3% Ozon) geleitet, wobei sich die Lösung schwach blauviolett färbte. Nach 10 Min. Stehen bei –80° wurde das Lösungsmittel ohne zu erwärmen i.Vak. abgezogen, der Rückstand mit 1 ml Methanol und 4 ml

Eisessig aufgenommen und mit Zinkstaub solange geschüttelt, bis eine Probe der Lösung auf Jodzinkstärke-Papier keine violette Farbe mehr zeigte. Dann wurde filtriert, mit Chloroform nachgewaschen und das Filtrat i.Vak. eingedampft. Der getrocknete Rückstand wurde mit Chloroform aufgenommen, die Lösung mit 1 n HCl, 1 m  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. eingedampft. Säulenchromatographische Auftrennung des Rückstands (16 mg) an 12 g Kieselgel durch Gradientenelution mit Fließmittel A lieferte 10 mg wenig verunreinigtes **10**. Diese wurden mit 2 mg Keton aus einem früheren Ansatz vereinigt und erneut an 12 g Kieselgel mit Fließmittel B chromatographiert. Die vereinigten Fraktionen 42–47 hinterliessen beim Abziehen des Lösungsmittels i.Vak. 10 mg reines Keton. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Cyclohexan Prismen vom Schmp. 251.5–252.5°. IR-Spektrum (Chloroform):  $1737\text{ cm}^{-1}$  (5-Ring-Keton). ( $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_3$  (306.449) Ber: C, 74.47; H, 9.87. Gef: C, 74.32; H, 9.76%).

(b) Aus 3 $\beta$ -Acetoxy-14-hydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -androstan-17-on (**11**). 5 mg des nach Danieli *et al.*<sup>14</sup> dargestellten **11** vom Schmp. 222–224° (Lit.<sup>14</sup> 226–228°) wurden in 0.6 ml Äthanol gelöst, mit 0.6 ml wässriger 0.5 n KOH versetzt und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 4 Std. wurde mit Essigsäure angesäuert, mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, die organische Phase neutral gewaschen und das Lösungsmittel i.Vak. abgezogen. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Hexan lag der Schmp. bei 248–251°. Das IR-Spektrum war mit dem des nach (a) dargestellten Präparats identisch.

*Kinetik der basenkatalysierten Bildung von  $\Delta^{17(20)}$ -Digitoxinsäure aus Digitoxin oder  $\Delta^{20(22)}$ -Digitoxinsäure (Abb 2)*

In mehreren identischen Ansätzen wurden in vorgewärmten Kölbchen je  $7.5 \times 10^{-8}$  Mol Digitoxin in 50  $\mu\text{l}$  Pyridin mit 5.0 ml wässriger 0.5 n KOH von 80° versetzt und bei  $80.00 \pm 0.1^\circ$  im Thermostaten gehalten. Nach den in Abb 2 angegebenen Zeiten wurde die Umsetzung durch Abkühlen im Eisbad abgebrochen und zur Lactonisierung der gebildeten  $\Delta^{17(20)}$ -Digitoxinsäure mit 1 ml Eisessig angesäuert. Nach 30 Min. Stehen wurden die angesäuerten Proben mit zweimal 12 ml Chloroform extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels i.Vak. wurden die Rückstände papierchromatographisch mit Di-n-propyläther-Tetrahydrofuran (3:2, Formamid-ges.) aufgetrennt und nach Elution der substanzhaltigen Flecke mit der Xanthhydrol-Reaktion<sup>16</sup> quantitativ bestimmt. Die Abweichung der Doppelbestimmungen vom Mittelwert betrug weniger als 2%. Im Falle der Bildung aus  $\Delta^{20(22)}$ -Digitoxinsäure wurden die Ansätze bis zur vollständigen Verseifung des Digitoxins zunächst 1 Std. bei 20° gehalten und anschliessend im Thermostaten auf 80° erwärmt. Zur Aufarbeitung und quantitativen Bestimmung der Proben vgl. oben.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> C. Lindig und K. R. H. Repke, *Tetrahedron* **28**, 1847 (1972)
- <sup>2</sup> C. Lindig und K. Repke, *Mber. Dt. Akad. Wiss.* **5**, 237 (1963)
- <sup>3</sup> W. A. Jacobs und E. L. Gustus, *J. Biol. Chem.* **78**, 573 (1928)
- <sup>4</sup> O. Schindler und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **39**, 1876 (1956)
- <sup>5</sup> N. M. Shah, K. Meyer und T. Reichstein, *Pharmac. Acta Helvetiae* **24**, 113 (1949)
- <sup>6</sup> F. Kaiser, *Chem. Ber.* **88**, 556 (1955)
- <sup>7</sup> J. H. Russel, O. Schindler und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **43**, 167, 1861 (1960)
- <sup>8</sup> A. Kuritzkes, J. v. Euw und T. Reichstein, *Ibid.* **42**, 1502 (1959)
- <sup>9</sup> M. Frèrejacque, *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **248**, 3027 (1959)
- <sup>10</sup> M. S. Ragab, H. Linde und K. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **45**, 474 (1962)
- <sup>11</sup> R. N. Jones und F. Herling, *J. Org. Chem.* **19**, 1252 (1954)
- <sup>12</sup> L. J. Bellamy, *Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution*, (Übersetzung von W. Brügel) S. 148. Steinkopff-Verlag, Darmstadt (1966)
- <sup>13</sup> K. Meyer und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **30**, 1508 (1947)
- <sup>14</sup> N. Danieli, Y. Mazur und F. Sondheimer, *Tetrahedron* **23**, 715 (1967)
- <sup>15</sup> F. Neuwald, *J. Am. pharmac. Assoc., sci. Edit.* **39**, 172 (1950)
- <sup>16</sup> M. Pesez, *Ann. pharmac. franç.* **10**, 104 (1952)
- <sup>17</sup> H. Mitsuhashi, T. Nomura und M. Fukuoka, *Steroids* **4**, 483 (1964)