

223. Chemischer Beweis der 12 β -HO-Gruppe in Diginatigenin

von Horst Linde, James E. Murphy und Kuno Meyer

(21. VIII. 59)

Für Vergleichszwecke benötigten wir den bisher noch unbekanntem 3 β ,12 β ,16 β -Triacetoxy-14-hydroxy-5 β ,14 β -Ätiansäure-methylester (VIII). Dieser Ester wäre am einfachsten durch oxydativen Abbau des ihm entsprechenden Cardenolids VI, des Diginatigenins, zu gewinnen. Dieses digitaloide Aglykon ist vor wenigen Jahren von MURPHY¹⁾ bei der sauren Hydrolyse eines neuen herzwirksamen Glykosids (Diginatin) erhalten worden. MURPHY hat diesem Aglykon mit Vorbehalt die Strukturformel VI erteilt. Vor kurzem konnten TAMM & GUBLER²⁾ durch mikrobiologische Hydroxylierung mit *Fusarium lini* (BOLLEY) Gitoxigenin in VI überführen. Da am Beispiel des Digitoxigenins bereits gezeigt worden war, dass dieser Mikroorganismus eine Hydroxylgruppe in die 12 β -Stellung des Sterinskeletts einzuführen vermag³⁾, war die von MURPHY für Diginatigenin in Vorschlag gebrachte Formel VI mit grosser Sicherheit bewiesen. Ein absolut eindeutiger *chemischer* Beweis für die 12 β -ständige HO-Gruppe in VI ist bisher aber noch nicht erbracht worden.

Da Diginatigenin nur sehr schwer zugänglich ist, und da zu erwarten war, dass VI als Derivat des Gitoxigenins beim oxydativen Abbau wie dieses nur verhältnismässig wenig der gesuchten Ätiansäure geben würde, haben wir zunächst eine kleine Menge des Genins VI darauf verwandt, um direkt mit diesem Material den Beweis für das Vorliegen einer 12 β -ständigen HO-Gruppe in VI zu leisten.

Energische Hydrolyse des Glykosids Diginatin mit 2-proz. alkoholischer Salzsäure gab das Dianhydroprodukt III, das ohne nähere Charakterisierung direkt in die Diacetylverbindung IV übergeführt wurde. Diese erwies sich nach Smp., Mischprobe und IR.-Spektrum als völlig identisch mit dem aus Diacetyldigoxigenin (I) durch Wasserabspaltung, Bromierung an C-15 und HBr-Abspaltung erhaltenen 3,12-Di-O-acetyl-14,16-dianhydro-diginatigenin (IV) (= 3 β ,12 β -Diacetoxy-5 β -carda-14,16,20-(22)-trienolid).

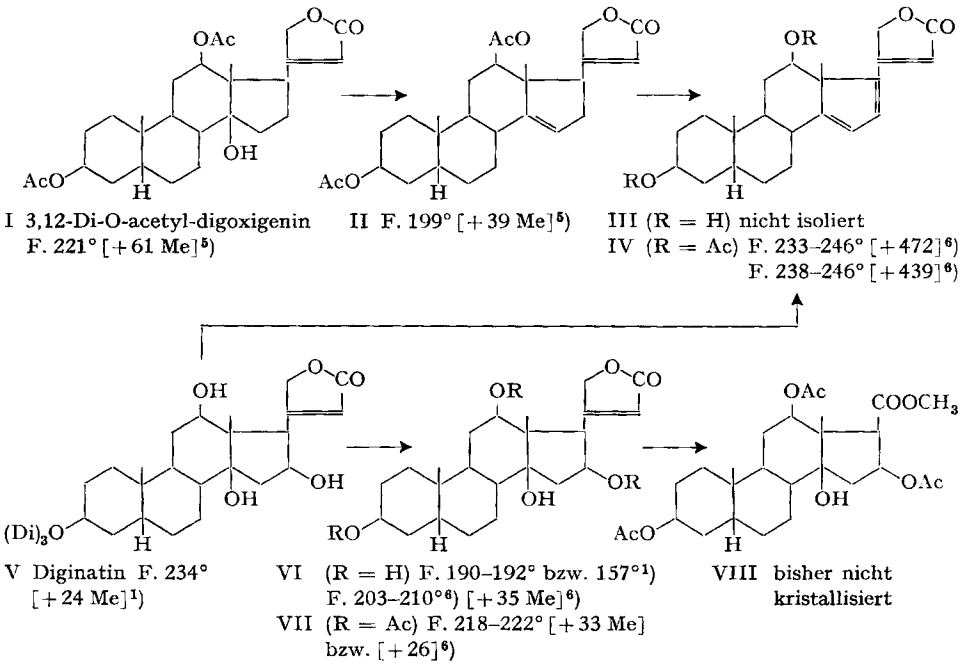
Der Rest der uns zur Verfügung stehenden Menge an Diginatin verwendeten wir zur Bereitung von Diginatigenin (VI), um dieses als Peracetylverbindung VII mit Ozon zum eingangs erwähnten Ester VIII abzubauen zu können. Diginatin – obwohl wie Digitoxin und Gitoxin ein Tridigitoxosid – lässt sich relativ schwer hydrolysieren. Wir erhielten das früher¹⁾ schon beschriebene Aglykon VI nur in rund 45-proz. Ausbeute, da sich daneben auch noch erhebliche Mengen von Anhydroprodukten bildeten. Da das acetylierte Genin bisher nicht näher charakterisiert worden ist, haben wir dies hier noch nachgeholt. Das 3,12,16-Tri-O-acetyl-diginatigenin (VII) kristallisiert aus einem Gemisch von Aceton-Äther-Pentan in feinen Plättchen vom Smp. 218–222° (Zers.) und $[\alpha]_D^{18} = +32,5^\circ \pm 2^\circ$ (in Methanol) bzw. $[\alpha]_D^{17} = +25,5^\circ \pm 2^\circ$ (in Chloroform).

¹⁾ J. E. MURPHY, J. Amer. pharmaceut. Assoc. (Sc. Ed.) **44**, 719 (1955).

²⁾ CH. TAMM & A. GUBLER, Helv. **41**, 1762 (1958).

³⁾ A. GUBLER & CH. TAMM, Helv. **41**, 297 (1958).

Es standen uns total 38 mg des 3,12,16-Tri-O-acetyl-diginatigenins (VII) für den Abbau zur Verfügung, den wir nach dem vielfach angewandten und bewährten Verfahren mit Ozon⁴⁾ durchführten. Es resultierten schliesslich 18 mg Abbauester, aus denen aber auch nach sorgfältiger chromatographischer Reinigung an Al₂O₃ keine Kristalle gewonnen werden konnten.



Ac = -CO-CH₃; Di = D(+)-Digitoxose. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Zahlen auf- oder abgerundete spezifische Drehung in Na-Licht an, wobei keine Bezeichnung Drehung in Chloroform, und Me Drehung in Methanol bedeutet.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze bis 200° ± 2°, darüber ± 3°.

3,12-Di-O-acetyl-14,16-dianhydro-diginatigenin (IV). – a) Aus Diginatigenin (V). 80 mg Diginatin (V) vom Smp. 182–195° (!) wurden in 4 ml 96-proz. Äthanol gelöst, mit 0,23 ml 36-proz. HCl versetzt und hierauf 50 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Eindampfen im Vakuum (unter Zusatz von Wasser) wurde erschöpfend mit Chloroform-Äther-(1:4) extrahiert und die organische Phase nacheinander mit verd. Na₂CO₃-Lösung und Wasser neutral gewaschen. Trocknen über Sulfat und Eindampfen im Vakuum gab rund 40 mg Rückstand, der in 1,5 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid zunächst 1½ Std. auf 80° erhitzt und hierauf noch 37 Std. bei etwa 50° stehen gelassen wurde. Übliche Aufarbeitung, Filtrieren des rohen Acetylproduktes (in Benzol) durch wenig Al₂O₃ und Eindampfen im Vakuum gab 38 mg Rückstand. Aus Aceton-Pentan 22 mg Kristalle vom Smp. 226–243° (Zers.); nach dem Umlösen aus dem selben Lösungsmittelgemisch 17 mg lange Nadeln vom Smp. 233–246° (Zers.). Die Mischprobe mit dem aus I bereiteten Trien

⁴⁾ K. MEYER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **30**, 1508 (1947).

⁵⁾ S. SMITH, *J. chem. Soc.* **1930**, 2478.

⁶⁾ Siehe Exp. Teil dieser Arbeit.

IV vom Smp. 235–245° (Zers.) schmolz bei 234–246° (Zers.); $[\alpha]_D^{21} = +472^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,127$ in Chloroform). Das IR.-Spektrum war völlig identisch mit dem IR.-Spektrum des aus I erhaltenen Triens IV. UV.-Spektrum: $\lambda_{\max.} = 332 \text{ m}\mu$ und $\log \epsilon = 4,21$ (in Alkohol).

b) Aus 3,12-Di-O-acetyl-14-anhydro-digoxigenin (II). 570 mg 3,12-Di-O-acetyl-digoxigenin (I) vom Smp. 216–222° wurden in 8 ml trockenem Pyridin gelöst, auf -15° abgekühlt und mit 0,8 ml ebenfalls gekühltem SOCl_2 versetzt, wobei sich die Lösung gelbbraun färbte. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Std. bei 20° stehengelassen, hierauf im Vakuum stark eingengt, der Rückstand mit kleinen Stückchen Eis versetzt und mit Chloroform-Äther-(1:4) ausgeschüttelt. Die in üblicher Weise neutral gewaschene organische Phase gab nach dem Trocknen über Sulfat, Filtrieren und Eindampfen im Vakuum 640 mg eines schwach gelb gefärbten Lacks, der aus Aceton-Äther-Pentan 490 mg Kristalle vom Smp. 192–199° gab. Nach einmaligem Umlösen aus dem selben Lösungsmittelgemisch 435 mg 3,12-Di-O-acetyl-14-anhydro-digoxigenin (II), Smp. 196–200°. 320 mg II wurden in einem Schliffkölbchen mit aufgesetztem Rückflusskühler und CaCl_2 -Verschluss in 17 ml CCl_4 gelöst und mit 345 mg N-Bromsuccinimid versetzt. Das Kölbchen wurde auf einem Wasserbadring, der bis zur Höhe des innern Flüssigkeitsspiegels reichte, von unten her während 30 Min. mit einer UV.-Lampe bestrahlt, wobei die Distanz zum Kölbchen so gross gewählt wurde, dass das CCl_4 gerade leicht siedete⁷⁾. Nach dem Erkalten wurde vom Ungelösten abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 5 ml trockenem Pyridin gelöst und 30 Min. auf 80° erhitzt. Eindampfen im Vakuum und übliche Aufarbeitung in Chloroform-Äther-(1:4) gab 265 mg Neutralteil, der an 12 g Al_2O_3 chromatographiert wurde. Das mit Benzol eluierte Material (57 mg) schmolz bei 223–245° und gab nach Rechromatographie 36 mg Kristalle (aus Aceton-Äther-Pentan) vom Smp. 238–246°; $[\alpha]_D^{22} = +439^\circ \pm 2^\circ$ ⁸⁾.

Das IR.-Spektrum war völlig identisch mit dem oben aus V erhaltenen Dianhydroprodukt IV. Das UV.-Absorptionsspektrum (in Alkohol) zeigte das erwartete Maximum bei $332 \text{ m}\mu$ und $\log \epsilon = 4,29$ ⁹⁾.

3,12,16-Tri-O-acetyl-diginatigenin (VII). 177 mg Diginatin vom Smp. 182–195° (!) wurden in 13 ml Methanol gelöst, mit 13 ml 0,1-n. H_2SO_4 versetzt und 25 Min. auf 70° erhitzt. Das nach üblicher Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt erwies sich auf Grund der papierchromatographischen Untersuchung zum grössten Teil als Ausgangsmaterial. Es wurde deshalb nochmals in 10 ml Methanol gelöst, mit 10 ml 0,1-n. H_2SO_4 versetzt und 30 Min. auf dem Dampfbad in lebhaftem Sieden gehalten. Übliche Aufarbeitung und papierchromatographische Kontrolle des Rückstandes ergab, dass die Hydrolyse noch unvollständig war. Der Rückstand wurde wiederum in 10 ml Methanol gelöst, nun aber mit 10 ml 0,2-n. H_2SO_4 versetzt und 40 Min. auf dem Dampfbad wie oben erhitzt. Nach üblicher Aufarbeitung resultierten 90 mg neutrales Rohprodukt, das im Papierchromatogramm sich als frei von Ausgangsmaterial erwies. Durch Chromatographie an Al_2O_3 konnte keine genügende Reinigung des Genins erzielt werden. Das so vorgereinigte rohe Genin (75 mg) wurde deshalb mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie¹⁰⁾ weiter aufgeteilt. Das ganze zur Verfügung stehende Material wurde in Chloroform gelöst, auf 8 mit Formamid imprägnierte Papierbogen (WHATMAN Nr. 1, $19 \times 46 \text{ cm}$) verteilt und im System Formamid/Chloroform während 13 Std. entwickelt. Nach Lokalisierung der durch Diginatigenin verursachten Zonen im UV. wurden diese herausgeschnitten und wie üblich¹¹⁾ extrahiert.

⁷⁾ Da bei der Bromierung mit Bromsuccinimid immer elementares Brom entsteht, das nicht nur die Doppelbindung an C-14–C-15 anzugreifen vermag, sondern auch den Hexadienolid-Ring an C-17, dürfte eine Modifikation, wie sie eben von J. H. LOOKER & M. J. HOLM, J. org. Chemistry **24**, 567 (1959), beschrieben wird – wobei das entstehende Brom fortlaufend mit dem Lösungsmittel abdestilliert – auch im vorliegenden Fall die Ausbeuten wesentlich verbessern.

⁸⁾ Dieser Wert ist etwa rund 30° niedriger als der Wert, der für das aus Diginatin erhaltene Trien IV gefunden wurde. Wir nehmen an, dass der grössere Drehungsbetrag der richtigere ist, d. h. dem reineren Trien IV entspricht, und dass der hier gemessene Wert infolge einer Verunreinigung zu tief gefunden wurde.

⁹⁾ Nach L. DORFMAN, Chem. Reviews **53**, 47 (1953), liegt das Maximum solcher 14,16-Verbindungen bei $332\text{--}337,5 \text{ m}\mu$ mit $\log \epsilon = 4,25\text{--}4,35$.

¹⁰⁾ E. v. ARX & R. NEHER, Helv. **39**, 1664 (1956).

¹¹⁾ H. LINDE & K. MEYER, Pharmac. Acta Helv. **33**, 327 (1958), siehe besonders Fussnote 14 auf S. 337.

Das dabei gewonnene Rohprodukt wurde in Benzol gelöst. Die Lösung wurde durch wenig Al_2O_3 filtriert und gab nach dem Verjagen des Lösungsmittels im Vakuum 60 mg Rückstand. Aus Aceton-Chloroform-Äther 40 mg Kristalle vom Doppel-Smp. 95–105°/198–205°. Nach dem Umkristallisieren wurden 28 mg körnige Kristalle vom Doppel-Smp. 115–130°/200–206° erhalten, die im Papierchromatogramm nur *einen* Fleck gaben, der authentischem Diginatigenin (VI) entsprach. Misch-Smp. mit letzterem (Smp. 196–206°) bei 120–140°/194–206°. Nach nochmaligem Umlösen aus Chloroform-Äther wurde schliesslich der einfache Smp. 203–210° beobachtet; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +34,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,022$ in Chloroform). 39 mg V vom Smp. 196–206° sowie 20 mg gute noch durchkristallisierende Mutterlaugenrückstände wurden in 2 ml Pyridin gelöst, mit 1,4 ml Acetanhydrid versetzt, 1 Std. auf dem Dampfbad erhitzt und anschliessend noch 36 Std. bei 34° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum und üblicher Aufarbeitung in Chloroform-Äther-(1:4) wurden 50 mg Trockenrückstand erhalten, die aus Aceton-Äther-Pentan 40 mg VII als feine Plättchen vom Smp. 209–218° (Zers.) gaben. Nach mehrmaligem Umkristallisieren 20 mg vom Smp. 218–222° (Zers.) (Sintern ab 214°). $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +32,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,027$ in Methanol); $[\alpha]_{\text{D}}^{17} = +25,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,153$ in Chloroform).

Ozonolyse von VII. 38 mg VII vom Smp. 212–221° wurden in 3 ml Essigester gelöst und bei –80° in Intervallen von 5–10 Min. 6mal während je 2 Min. ozonhaltiger (3,5-proz.) Sauerstoff eingeleitet (150 ml/Min.). Nach üblicher Aufarbeitung¹²⁾ wurden 12 mg Neutralteil und 22 mg rohe Säure erhalten, die mit ätherischem Diazomethan methyliert und anschliessend wie oben bei der Acetylierung des Diginatigenins beschrieben, nachacetyliert wurde. Der nach üblicher Aufarbeitung anfallende Methylester war ölig und liess sich auch nach Chromatographie an Al_2O_3 nicht in Kristallen gewinnen.

SUMMARY

The 12β -HO-group in diginatenin was unambiguously proved by chemical connexion of this aglycon with digoxigenin.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel
und Analytical Research Laboratory of
BURROUGHS WELLCOME & CO. (U.S.A.) Inc., Tuckahoe, N.Y.

¹²⁾ Vgl. z. B. S. PATAKI, K. MEYER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 1295 (1953), besonders S. 1307.

224. Sterische Einflüsse einer 16α -Methylgruppe auf Reaktionen in der Seitenkette von Allopregnan-Verbindungen

Über Steroide, 159. Mitteilung¹⁾

von K. Heusler, J. Kebrle, C. Meystre, H. Ueberwasser, P. Wieland,
G. Anner und A. Wettstein

(22. VIII. 59)

In den letzten Jahren hat sich die Forschung auf dem Gebiet der Nebennierenrindenhormone angelegentlich mit der Gewinnung modifizierter Corticoide befasst. Signifikante Wirkungsveränderungen und -steigerungen wurden insbesondere bei solchen Derivaten des Hydrocortisons beobachtet, die Strukturveränderungen in unmittelbarer Nachbarschaft der funktionellen Gruppen aufweisen. Zu ihnen gehören

¹⁾ 158. Mitt.: K. HEUSLER, P. WIELAND & A. WETTSTEIN, *Helv.* **42**, 1586 (1959).