

Experimentelles. – *Bestimmung der Decarboxylierungstemperatur.* 0,2–0,5 g der zu untersuchenden Substanz wurde in ein kleines Sublimationsrohr gegeben, das mit einem Wassersäulenmanometer verbunden war. Das Rohr mit der Substanzprobe wurde in einen grossen, elektrisch beheizten Aluminiumblock gegeben und pro Minute um 5° erhitzt.

Zwischenprodukte. Die Darstellung der zum grössten Teil bekannten Zwischenprodukte und der daraus hergestellten heterocyclischen Carbonsäuren ist bei ¹⁾ und ²⁾ erwähnt.

SUMMARY

When solid heterocyclic dicarboxylic acids and their hexamethylenediammonium salts are heated in a sealed system, temperature-pressure diagrams are obtained which allow the determination of the exact temperature at which decarboxylation starts. Some decarboxylation points are indicated.

Dissociation constants (in 80% methylcellosolve) of 13 heterocyclic mono- and 16 dicarboxylic acids have been determined.

It is shown, that the decarboxylation point of solid heterocyclic dicarboxylic acids depends on the strength of the acid: strong acids decarboxylate at low temperatures.

The decarboxylation temperature of salts does not depend on the strength of the corresponding acid.

Technisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

128. Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen. IV. 7 β -Hydroxylierung von Digitoxigenin durch *Aspergillus oryzae* (AHLB.) COHN, *Rhizopus arrhizus* FISCHER und *Trichothecium roseum* LINK (*Cephalothecium roseum* CDA.)¹⁾

7. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen²⁾

von G. Juhasz und Ch. Tamm

(20. IV. 61)

Der überraschende Befund, dass Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) z. B. Testosteron, 3,17-Dioxo- Δ^4 -androst- α -3-en, Progesteron und Cortexon in 15 α -Stellung³⁾, Aglykone der Cardenolid- und Bufadienolid-Reihe jedoch ausschliesslich in 12 β -Stellung⁴⁾ hydroxylieren, veranlasste uns, die Substratspezifität der Hydroxylasen weiterer Organismen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Resultate, welche wir bei der Umsetzung von Digitoxigenin (II) mit *Aspergillus oryzae* (AHLB.) COHN, *Rhizopus arrhizus* FISCHER und *Trichothecium roseum* LINK (*Cephalothecium roseum* CDA.) erzielten. Von *R. arrhizus* ist bekannt, dass die Δ^4 -3-Ketone der Androstan- und Pregnan-Reihe in 6 β - und 11 α -Stellung, gesättigte 5 α -

¹⁾ Aus der Dissertation G. JUHASZ, Basel 1961.

²⁾ 6. Mitt.: CH. TAMM, Helv. 43, 338 (1960).

³⁾ A. GUBLER & CH. TAMM, Helv. 41, 301 (1958).

⁴⁾ A. GUBLER & CH. TAMM, Helv. 41, 297 (1958); CH. TAMM & A. GUBLER, Helv. 41, 1762 (1958); 42, 239, 473 (1959).

Pregnanderivate indessen statt in 6 β - in 7 β -Stellung oxygeniert werden⁵⁾ 6). Demgegenüber greift *T. roseum* neben den 6 β -, 11 α - und 11 β -Stellungen vorwiegend an C-17 an, unter Bildung von 17 α -Hydroxy-Derivaten⁵⁾. Hydroxylierungen mit *A. oryzae* sind in der Literatur unseres Wissens bisher nicht beschrieben worden.

Die mikrobiologischen Versuche wurden genau gleich wie in früheren Mitteilungen beschrieben⁴⁾ in Schüttelkulturen unter aeroben Bedingungen bei 25–27° durchgeführt, wobei der Reaktionsablauf zuerst papierchromatographisch verfolgt und hierauf die Produkte nach Möglichkeit isoliert und identifiziert wurden.

Die Inkubation von Digitoxigenin (II) mit *Aspergillus oryzae* während 14 Tagen ergab einen recht guten, jedoch keinen totalen Umsatz⁷⁾. Im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 1) waren zunächst die 5 Flecke A, B, C, D und F sichtbar, wobei sich F in einem andern Lösungsmittelsystem in die Komponenten F₁ und F₂ auftrennte (vgl. Fig. 2). Nach der präparativen Trennung an der Al₂O₃-Säule liessen sich 3-Dehydrodigitoxigenin (I) (Fleck A; 8–28%⁸⁾), unverändertes Ausgangsmaterial II (Fleck B; 18–22%), sowie ein neues Cardenolid, für das die Konstitution des 7 β -Hydroxydigitoxigenins (VI) (Fleck D; 22–35%) abgeleitet werden konnte (Konstitutionsbeweis siehe unten), in reiner krist. Form isolieren. Eine dem Fleck C entsprechende Substanz war nicht zu fassen, da sie nur in Spuren gebildet wurde. Fleck F₁ konnte keinem bekannten Stoff zugeordnet werden. Bei Fleck F₂ könnte es sich um das neue Monohydroxydigitoxigenin IV (Substanz G. J. 3) handeln, welches bei der Umsetzung von Digitoxigenin (II) mit *R. arrhizus* in grösserer Menge isoliert wurde⁹⁾ (siehe weiter unten).

Die mikrobiologische Umwandlung von Digitoxigenin (II) mit Kulturen von *Rhizopus arrhizus* erwies sich als sehr empfindlich. Einmal bewirkten nur gewisse Stämme einen merklichen Umsatz; ferner war die Reaktion nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen des Organismus erfolgreich, wobei die Grösse der Kulturfässer und die Art der Durchmischung sich als besonders kritische Faktoren erwiesen. Das Papierchromatogramm des Rohprodukts liess zunächst die 6 Flecke A–F erkennen (vgl. Fig. 3). Fleck A war aber nicht einheitlich; er bestand aus den Komponenten A₁ und A₂ (vgl. Fig. 4). Nach Chromatographie an Al₂O₃ konnten neben etwas Ausgangsmaterial II (Fleck B) erneut 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) (Fleck D; 13–40%) als Hauptprodukt, sowie ein weiteres unbekanntes Monohydroxydigitoxigenin IV (Substanz G. J. 3) (Fleck F; 5,5–15%) in reinen Kristallen isoliert werden. Die Analysenwerte dieses Stoffes stimmten auf die Formel C₂₃H₃₄O₅. Das UV.-Spektrum wies neben dem für die Cardenolide typischen Absorptionsmaximum keine weiteren Banden auf (vgl. Fig. 9). Smp. und spez. Drehung passten gut auf Sarmento-

⁵⁾ Vgl. E. VISCHER & A. WETTSTEIN, *Advances in Enzymol.* 20, 237 (1958); weitere Literaturangaben daselbst.

⁶⁾ Die 6-Stellung ist durch die Δ^4 -3-Keton-Gruppierung stark aktiviert und wird deshalb durch die meisten Organismen angegriffen.

⁷⁾ Die ersten Versuche mit diesem Organismus wurden von Frl. A. GUBLER durchgeführt.

⁸⁾ Die Ausbeuten der Reaktionsprodukte werden hier und im folgenden so angegeben, dass sich die höhere Zahl auf die Menge des papierchromatographisch einheitlichen Rohprodukts und die niedrigere Zahl auf die Menge an daraus isoliertem Reinkristallat beziehen.

⁹⁾ Gelegentlich konnten noch geringe Mengen eines weiteren unbekannten Cardenolids vom Smp. 208–214° (Substanz A.G. 5) isoliert werden. In den Papierchromatogrammen lief es wesentlich langsamer als Digitoxigenin (II).

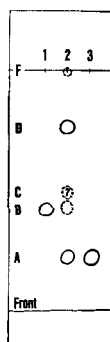
Papierchromatogramme¹⁰⁾

Fig. 1
Be-Chf-(7:5)/
Fmd; 2,5 Std.

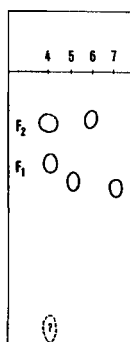


Fig. 2
Chf/Fmd;
12 Std.

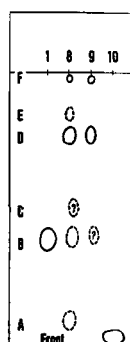


Fig. 3
Be-Chf-(7:5)/
Fmd; 3 Std.

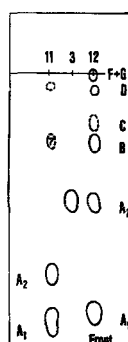


Fig. 4
Be/Fmd;
3 Std.

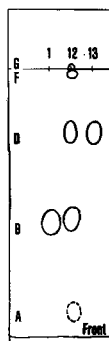


Fig. 5
Be-Chf-(7:5)/
Fmd; 3 Std.

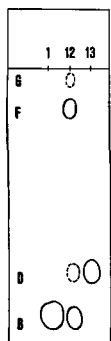


Fig. 6
Chf/Fmd;
3 Std.

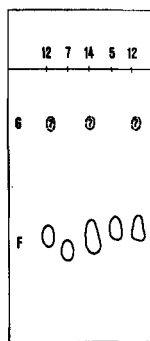


Fig. 7
Chf/Fmd;
18 Std.

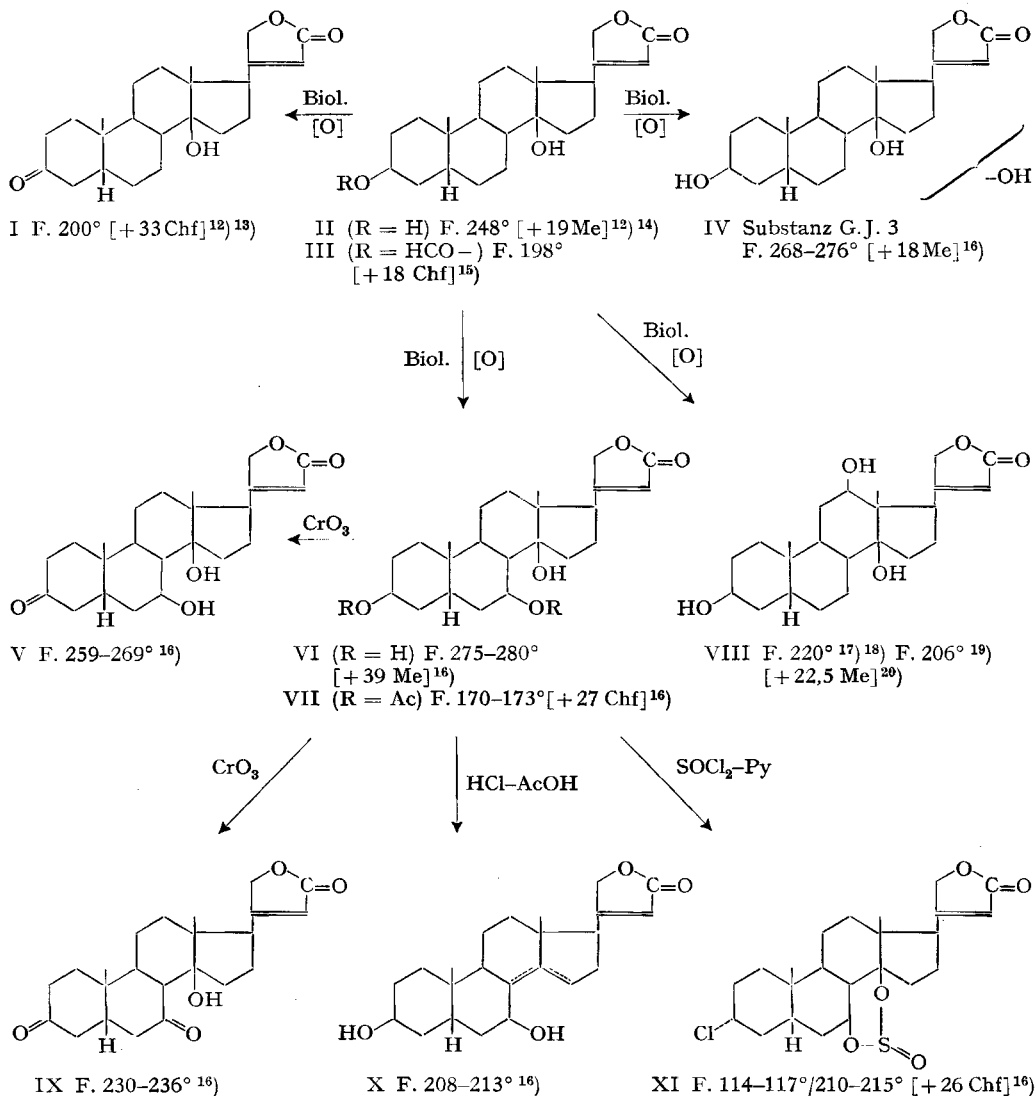


Fig. 8
Be/Fmd;
2,5 Std.

- 1 = Digitoxigenin (II).
- 2 = Rohes Reaktionsgemisch aus Digitoxigenin (II) mit *Aspergillus oryzae*.
- 3 = 3-Dehydrodigitoxigenin (I).
- 4 = Fraktion Nr. 27 der Al_2O_3 -Chromatographie des rohen Reaktionsgemisches aus Digitoxigenin (II) mit *Aspergillus oryzae*.
- 5 = Digoxigenin (VIII).
- 6 = Monohydroxydigitoxigenin IV (= Substanz G.J. 3).
- 7 = Sargentogenin.
- 8 = Rohes Reaktionsgemisch aus Digitoxigenin (II) mit *Rhizopus arrhizus*.
- 9 = Rohes Reaktionsgemisch aus 3-O-Formyl-digitoxigenin (III) mit *Rhizopus arrhizus*.
- 10 = 3-O-Formyl-digitoxigenin (III).
- 11 = Fleck A aus Umsatz von Digitoxigenin (II) mit *Rhizopus arrhizus*.
- 12 = Rohes Reaktionsgemisch aus Digitoxigenin (II) mit *Trichothecium roseum*.
- 13 = 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI).
- 14 = Sargentogenin + Rohprodukt von Digitoxigenin (II) mit *Trichothecium roseum*.
- 15 = 7,14-Cyclosulfat XI aus 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI).

¹⁰⁾ Ausgeführt bei 22–25°. An der Startlinie wurden pro Fleck 0,05–0,1 mg Substanz aufgetragen. Für weitere Einzelheiten und Abkürzungen der Lösungsmittel vgl. die Allg. Bemerkungen im exper. Teil.

Formelschema



Ac = $\text{CH}_3\text{CO}-$. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die spez. Drehungen für Na-Licht an.
 Chf = Chloroform, Me = Methanol.

¹²⁾ A. WINDAUS & G. STEIN, Ber. deutsch. chem. Ges. 61, 2436 (1928).

¹³⁾ K. MEYER & T. REICHSTEIN, Helv. 30, 1508 (1947).

¹⁴⁾ F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, Helv. 28, 1472 (1945).

¹⁵⁾ H. P. SIGG, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. 36, 985 (1953).

¹⁶⁾ Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

¹⁷⁾ S. SMITH, J. chem. Soc. 1930, 508.

¹⁸⁾ M. STEIGER & T. REICHSTEIN, Helv. 21, 828 (1938).

¹⁹⁾ S. PATAKI, K. MEYER & T. REICHSTEIN, Helv. 36, 1295 (1953).

²⁰⁾ A. STOLL & W. KREIS, Helv. 16, 1049 (1933).

genin; doch waren die Rf-Werte der beiden Verbindungen stark verschieden. Weitere Untersuchungen wurden mit dieser Substanz noch nicht durchgeführt. – Die A₁-, A₂-, C- und E-haltigen Fraktionen waren so klein, dass aus ihnen keine entsprechenden krist. Stoffe zu gewinnen waren. Die Flecke konnten keinen bekannten Stoffen zugeordnet werden; bei A₁ und A₂ handelt es sich sicher nicht um 3-Dehydrodigitoxigenin (I) (vgl. Fig. 4).

In einem weiteren Versuch wurde 3-O-Formyl-digitoxigenin (III) als Edukt eingesetzt, um zu prüfen, ob sich durch Variation des Substrats die Umsetzung verbessern liesse. Die papierchromatographische Kontrolle (vgl. Fig. 3) ergab, dass III zuerst sehr rasch vollständig deformyliert wird und dass das gebildete Digitoxigenin (II) sofort vorwiegend in 7 β -Stellung hydroxyliert wird. Gleichzeitig entsteht etwas Monohydroxydigitoxigenin IV (Subst. G. J. 3). Die Verwendung von 3-O-Formyl-digitoxigenin (III) als Substrat bietet für die Herstellung von VI jedoch keine wesentlichen Vorteile.

Die hydroxylierenden Enzyme von *R. arrhizus* sind ziemlich substratspezifisch, denn weder bei den sauerstoffreicheren Aglykonen Sarmentogenin, Digoxigenin, Gitoxigenin, Coroglaucigenin, Strophanthidin und Strophanthidol noch bei den Glykosiden Digitoxin und Gitoxin war nach der Inkubation eine chemische Veränderung zu beobachten.

Mit Kulturen von *Trichothecium roseum* reagierte Digitoxigenin (II) nur sehr langsam. Nach 14–18 Tagen erschienen im Papierchromatogramm neben viel Ausgangsmaterial II 4–5 neue Flecke (vgl. Fig. 4). Die Produkte wurden in diesem Falle wegen der geringen Quantität nicht isoliert, dafür aber einer sorgfältigen papierchromatographischen Analyse unterzogen. Sie ergab folgende eindeutige Zuordnungen: Fleck A₂ entspricht 3-Dehydrodigitoxigenin (I)¹¹, Fleck B Digitoxigenin (II), und bei Fleck D liegt 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) vor (vgl. Fig. 5 und 6). Schwieriger gestaltete sich die Identifizierung von Fleck F. Die Laufstrecken wiesen zunächst auf Sarmentogenin hin; doch traten z. B. im System Chloroform/Formamid deutliche Abweichungen auf, was auch das Misch-Chromatogramm bestätigte (vgl. Fig. 7). Der Rf-Wert stimmte hingegen sehr gut mit demjenigen von Digoxigenin (VIII) überein. Damit im Einklang waren auch die Laufstrecken und die nach Besprühen der Flecke mit H₂SO₄-Äthanol-(1:1) erhaltenen Färbungen im Dünnschichtchromatogramm. Neben der 7 β -Hydroxylierung hat demnach nicht wie erwartet eine Oxygenierung in 11 α -, sondern in 12 β -Stellung stattgefunden.

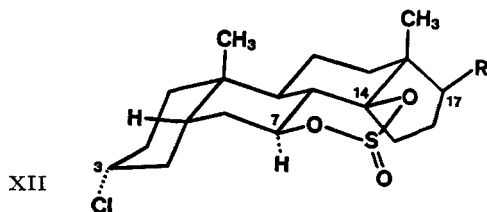
Konstitutionsbeweis für 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI). Die Analysenwerte ergaben die Bruttoformel C₂₃H₃₄O₅. Nach den UV.- und IR.-Spektren (vgl. Fig. 9 und 10) war der Butenolidring bei der mikrobiologischen Umwandlung intakt geblieben. Der Stoff konnte mit keinem bekannten Cardenolid identifiziert werden, so dass ein neues monohydroxyliertes Digitoxigeninderivat vorlag. Das neue Aglykon lieferte mit Acetanhydrid-Pyridin das Di-O-acetylderivat VII, das sowohl gegen CrO₃-H₂SO₄ in Aceton²¹) als auch gegen CrO₃ in Eisessig beständig war. Die Behandlung des freien Genins VI mit CrO₃-H₂SO₄ in Aceton²¹) ergab ausschliesslich neutrale Produkte.

¹¹) Bei Fleck A₁ könnte es sich eventuell um 1¹⁶-Digitoxigenin (16-Anhydrodigitoxigenin) handeln, das von TITUS *et al.*²⁰) nachgewiesen worden ist (siehe weiter unten).

²¹) K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, J. chem. Soc. 1946, 39; C. DJERASSI, R. R. ENGLE & A. BOWERS, J. org. Chemistry 21, 1547 (1956).

Somit handelt es sich bei der mikrobiologisch in die Digitoxigeninmolekel eingeführten Sauerstofffunktion um eine sekundäre, relativ leicht acetylierbare HO-Gruppe. Das Papierchromatogramm zeigte, dass sich bei der Oxydation von VI zwei neue Ketone gebildet hatten, deren präparative Trennung an der Al_2O_3 -Säule gelang. Das schwächer polare Keton IX vom Smp. 230–236° besitzt nach dem UV.-Spektrum, das ein weiteres Maximum bei 280 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 2,2$) aufwies, zwei unkonjugierte Carbonylgruppen, die sich auf Grund des IR.-Spektrums (neue Bande bei 5,84 μ) an sechsgliedrigen Ringen befinden müssen. Das UV.-Spektrum schliesst auch eine α - und β -Diketon-Gruppierung eindeutig aus. Damit fielen die C-Atome 1, 2, 4, 15 und 16 als Verknüpfungsstellen für die neue HO-Gruppe ausser Betracht; es verblieben die Stellungen 6, 7 und 12 α ²²). Beim stärker polaren Keton vom Smp. 259–269° liegt nach dem UV.-Spektrum (neues Maximum bei 285 $\text{m}\mu$; $\log \epsilon = 2,0$) ein gesättigtes Monoketon vor. Im IR. war eine Bande bei 5,85 μ erkennbar. Es dürfte sich somit um das 3-Dehydroderivat V handeln.

Weitere Hinweise für die 7-Stellung der HO-Gruppe ergaben sich aus Wasserabspaltungsversuchen. Gegenüber Säuren erwies sie sich als ziemlich resistent. Nach Einwirken von konz. HCl bei 0°, Bedingungen, unter denen z. B. Gitoxigenin in $\Delta^{14,16}$ -Dianhydrogitoxigenin übergeht, wurde unverändertes Ausgangsmaterial zurückgewonnen. Unter energischeren Bedingungen, z. B. mit HCl-Eisessig bei 100°, entstand, vermutlich durch Elimination des tertiären (C-14)-Hydroxyls, das Monoanhydroderivat X. Es zeigte im kurzwelligen UV.-Gebiet zwei Maxima, nämlich bei 203 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,11$) und 214 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,10$), jedoch keine Absorption, die einem zusätzlichen konjugierten Dien entsprach.



Entscheidend für Festlegung der Position der neuen HO-Gruppe war die Reaktion mit SOCl_2 in Pyridin bei -15° . Es resultierte ein einziges Produkt XI, das im Papierchromatogramm viel rascher als das Ausgangsmaterial VI wanderte (vgl. Fig. 8). Im UV.-Spektrum war neben dem Butenolidring kein signifikanter Chromophor erkennbar (vgl. Fig. 9). Der Stoff enthielt Schwefel und Chlor. Dies bedeutet, dass an Stelle einer Elimination sich die Bildung eines cyclischen Sulfits vollzogen hat unter Benützung von 2 benachbarten HO-Gruppen. Die dritte HO-Gruppe ist durch Chlor substituiert worden. Das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 11) bestätigte dies durch das Fehlen einer Schwingung im Gebiet von 2,5–3 μ und durch das Auftreten einer komplexen Bande bei 8,14–8,16 μ und 8,23–8,25 μ (in CH_2Cl_2 -Lösung und fest in KBr), welche

²²) Ein aus einem weiteren Oxydationsversuch erhaltenes Präparat von IX zeigte im UV. neben dem Hauptmaximum bei 218 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,10$) das zweite bei 260–270 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 2,78$), was auf eine Verunreinigung durch 6–8% $\Delta^{8(14)}$ -7-Keton hinweist. Im IR.-Spektrum war eine weitere entsprechende zusätzliche Bande bei 5,95 μ (α, β -ungesättigtes Keton) vorhanden.

für die S-O-Streckschwingung von cyclischen Sulfiten charakteristisch ist²³). Aus sterischen Gründen ist die Bildung der S-Brücke, in welcher das 14-Hydroxyl den einen Brückenkopf darstellt, nur möglich, wenn sich die andere HO-Gruppe in 7 β -Stellung befindet. Hydroxyle in 6 α , 6 β , 7 α und 12 α -Stellung können diesen Ringchluss nicht eingehen und scheiden damit aus. Aus der Raumformel XII des Cyclosulfits ist zu erkennen, dass die beteiligten Substituenten an C-7 und C-14 äquatoriale Konfiguration besitzen, was für die Annullierung eines weiteren spannungsfreien 6-Ringes besonders günstig ist. Er nimmt die Konstellation eines Sessels ein. Das eingetretene Cl-Atom befindet sich in 3-Stellung und dürfte α -ständig an-

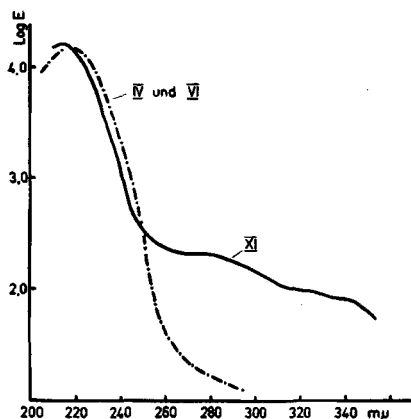


Fig. 9. UV.-Absorptionsspektren in Äthanol²⁴)

Kurve IV: Monohydroxydigitoxigenin (IV) (= Substanz G. J. 3) (ber. auf $C_{23}H_{34}O_5$), fällt mit Kurve VI zusammen.

Kurve VI: 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) (ber. auf $C_{23}H_{34}O_5$).

Kurve XI: 7,14-Cyclosulfit XI von 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) (ber. auf $C_{23}H_{31}O_5S$).

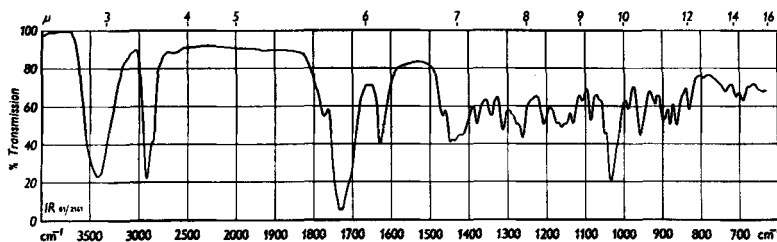


Fig. 10. IR.-Absorptionsspektrum von 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) fest in KBr²⁵)

²³) P. B. D. DE LA MARE, W. KLYNE, D. J. MILLER, J. G. PRITCHARD & D. WATSON, J. chem. Soc. 1956, 1813; D. BEN-ISHAY, J. org. Chemistry 23, 2013 (1958); vgl. auch die IR.-Spektren von Cyclosulfiten aus der Cardenolid- und Bufadienolid-Reihe bei G. VOLPP & CH. TAMM, Helv. 40, 1860 (1957); A. VON WARTBURG & J. RENZ, Helv. 42, 1620 (1959), und B. FECHTIG, J. VON EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. 43, 1570 (1960).

²⁴) Aufgenommen mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DK 2 im Spektallabor der SANDOZ A.G., Basel (Leitung Dr. H. G. LEEMANN).

²⁵) Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-Zweistrahlspektrophotometer, Modell 21 (NaCl-Prisma) im Spektallabor der SANDOZ A.G., Basel (Leitung Dr. H. G. LEEMANN).

geordnet sein. Mit diesen Reaktionen ist die Konstitution des 7 β -Hydroxydigitoxigenins (VI) eindeutig bewiesen.

Die Bestimmung der Toxizität²⁶⁾ von 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) nach HATCHER an der Katze ergab als geometrisches Mittel der letalen Dosis einen Wert von 1,85 mg/kg²⁷⁾. Der entsprechende Wert für Digitoxigenin (II) beträgt 0,42–0,46 mg/kg²⁸⁾. Demnach ist 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) 4 bis 4,4mal weniger cardiotoxisch als Digitoxigenin (II) und gleich wirksam wie Gitoxigenin²⁸⁾.

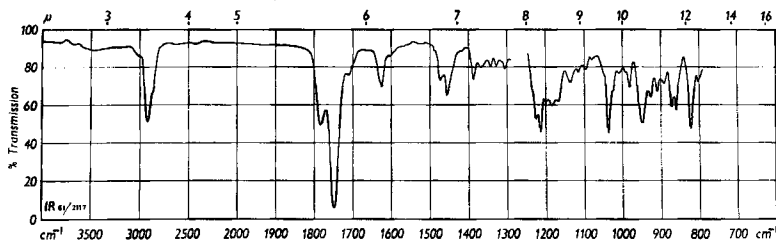


Fig. 11. IR.-Absorptionsspektrum des 7,14-Cyclosulfits XI aus 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) in CH_2Cl_2 -Lösung²⁵⁾

Vor kurzem isolierten TITUS und Mitarbeiter²⁹⁾ ein neues monohydroxyliertes, «biologisch inaktives» Digitoxigeninderivat nach Inkubation von Digitoxigenin (II) mit Kulturen von *Trichothecium roseum*, das durch ein Dibenzoat charakterisiert wurde. Sie erteilten ihm mit Vorbehalt die Konstitution des 6 β -Hydroxydigitoxigenins. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften dieses Genins liessen eine Identität mit unserem 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) vermuten. Ein direkter Vergleich der Präparate durch Misch-Smp. und im Papierchromatogramm bestätigte diese Vermutung³⁰⁾. Neben VI wiesen diese Autoren wie wir noch 3-Dehydrodigitoxigenin (I) und Δ^{16} -Monoanhydrodigitoxigenin sowie Sarmentogenin nach. Statt des letzteren Produkts haben wir eindeutig Digoxigenin nachweisen können. Es ist schwierig zu sagen, auf was diese Abweichung beruht³¹⁾.

Nach Abschluss unserer Untersuchungen erhielten wir Kenntnis einer vorläufigen Mitteilung von ISHII *et al.*³²⁾, in welcher die 7 β -Hydroxylierung von Digitoxigenin (II) durch *Rhizopus arrhizus* beschrieben wird. Weitere Umwandlungsprodukte sind nicht erwähnt. Die Daten von 7 β -Hydroxydigitoxigenin (IV) und des daraus bereiteten Mono- und Diketons (entspr. V und IX) der japanischen Autoren stimmen mit den

²⁶⁾ Die Prüfung verdanken wir Herrn Dr. W. SCHALCH, Pharmakologisches Laboratorium der SANDOZ A.G. (Leitung Dr. A. CERLETTI).

²⁷⁾ Orientierender Mittelwert von 4 Tieren. Mit 0,26-proz. Lösung in Äthanol-Propylenglykol und bei Applikation von 0,260 mg/Min. betrug die Letaldosis 1,45 mg/kg (2 Versuche); mit 0,065-proz. Lösung in Äthanol-Propylenglykol und bei Applikation von 0,065 mg/Min. betrug die Letaldosis 2,07 mg/kg (2 Versuche).

²⁸⁾ Vgl. CH. TAMM, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 13, 137 (1956).

²⁹⁾ E. TITUS, A. W. MURRAY & H. E. SPIEGEL, J. biol. Chemistry 235, 3399 (1960).

³⁰⁾ Wir danken Herrn Dr. E. TITUS, National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA, bestens für die Überlassung einer Vergleichsprobe.

³¹⁾ Ein Grund könnte in der Verschiedenheit der benützten Stämme liegen.

³²⁾ H. ISHII, Y. NOZAKI, T. OKUMURA & D. SATOH, J. pharmac. Soc. Japan 80, 1150 (1960). (Text japanisch.)

unserigen überein; der Smp. des Diacetats (entspr. VII) weicht jedoch ab. Inzwischen ist das Präparat von TITUS *et al.*²⁹⁾ mit dem japanischen 7 β -Hydroxydigitoxigenin direkt verglichen und als identisch befunden worden³³⁾. Deshalb ist an der Identität des japanischen Präparats mit unserem 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) nicht zu zweifeln.

Wir danken der SANDOZ A.G., Basel für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

I. Allgemeine Bemerkungen. – Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Messung der spez. Drehung, zur Aufnahme der UV.- und IR.-Spektren wurden ca. 1 Std. bei 0,02 Torr und 60–70°, und zur Analyse bei 0,01 Torr über P₂O₅ bei der angegebenen Zeit und Temperatur getrocknet. Übliches Aufarbeiten bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chloroform oder Chloroform-Alkohol (2:1), Waschen mit 2N HCl (bei CrO₃-Oxydationen mit 2N H₂SO₄), 2N Na₂CO₃-Lösung und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum. Die Adsorptionschromatogramme wurden nach der Durchlaufmethode³⁴⁾ mit neutralem Al₂O₃ der Aktivitätsstufe I der Fa. M. WOELM, Eschwege, Deutschland, oder an Silicagel (SiO₂, Korngrösse 0,15–0,30 mm) durchgeführt. Zur Papierchromatographie wurde Papier WHATMAN Nr. 1 und als stationäre Phase Formamid³⁵⁾ (Imprägnieren mit Formamid-Aceton-(1:4) nach ³⁶⁾) verwendet; Entwicklung mit KEDDE-Reagens³⁷⁾ oder RAYMOND-Reagens³⁸⁾. Dünnschichtchromatographie nach STAHL³⁹⁾. Entwicklung mit J₂-Dämpfen oder durch Besprühen mit 50-proz. H₂SO₄ in Äthanol und langsamem Erwärmen. Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ nach ³⁸⁾. – Die Mikroanalysen verdanken wir den mikroanalytischen Laboratorien des Instituts (Leitung: E. THOMMEN) und der SANDOZ AG., Basel (Leitung: Dr. W. SCHÖNIGER).

Es werden folgende Abkürzungen benützt: Ae = Äther, Pe = Petroläther, Be = Benzol, Alk = Äthanol, Me = Methanol, Chf = Chloroform, An = Aceton, Fmd = Formamid.

II. Kultur der Mikroorganismen und Aufarbeitung der Kulturansätze⁴⁰⁾. – Proben einer Schrägagarkultur (Herkunft: AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, Washington D. C., USA (ATCC) und CENTRALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Baarn, Niederlande (CBS)) wurden entweder direkt als Impfmateriel für die Nährlösungen verwendet oder zur Sporulierung auf Reissnährmedium (13 g polierter Reis und 25 ml Wasser in ERLNMEYER-Kolben von 500 ml; sterilisiert) überimpft. Beim letzten Fall wurde eine wässrige Suspension der drei Wochen alten, bei 27° inkubierten Kulturen als Impfmateriel verwendet. Zum Versuch kamen 100-ml- (bzw. 300-ml- bzw. 500-ml-) ERLNMEYER-Kolben mit je 20 ml (bzw. 60 ml bzw. 100 ml) Nährlösung, oder sog. Schüttelenten (Kulturgefässe von 4 Liter Inhalt) zur Anwendung. Diese wurden bei 120° während 20 Min. im Dampfautoklav sterilisiert. Die Kulturgefässe wurden dann beimpft und die ERLNMEYER-Kolben auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 bzw. 190 Umdrehungen/Min.) und die Schüttelenten auf einem Schüttelturm bei 27° 3–10 Tage inkubiert, worauf das in Aceton gelöste Substrat nach Sterilfiltration zugegeben wurde.

Verwendete Nährlösungen. – CZAPEK-Nährlösung: 30 g Saccharose; 3,0 g NaNO₃; 1 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄·7H₂O; 0,5 g KCl und 10 mg FeSO₄·7H₂O mit dest. Wasser *ad* 1000 ml; pH auf 7,3 eingestellt.

Malz-Nährlösung: 20 g Malzextrakt mit Leitungswasser *ad* 1000 ml.

³³⁾ Briefliche Mitteilung von Herrn Dr. E. TITUS, für die wir ihm bestens danken.

³⁴⁾ T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* 7, 305 (1949).

³⁵⁾ O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 108 (1951).

³⁶⁾ H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 36, 357 (1953).

³⁷⁾ I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.* 52, 643 (1952).

³⁸⁾ J. VON EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 883 (1948).

³⁹⁾ E. STAHL, *Pharmazie* 17, 633 (1956); *Chemiker-Ztg.* 82, 323 (1958); *Parfümerie Kosmet.* 39, 564 (1958).

⁴⁰⁾ Wir danken den Herren Dres. CH. STOLL und W. LOEFFLER, Institut für spezielle Botanik, ETH, Zürich, für ihre Hilfe und zahlreichen Ratschläge.

Malz-Pepton-Nährlösung: 20 g Malzextrakt; 1,0 g Pepton und 20 g Glucose mit dest. Wasser ad 1000 ml.

Kartoffel-Dextrose-Nährlösung: 300 g geschälte und zerkleinerte Kartoffeln und 20 g Glucose. – Kartoffeln in 500 ml dest. Wasser gekocht bis weich, durch Nylogewebe filtriert, ausgepresst und mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt; hierauf Glucose zugesetzt.

«Sporulation»-Nährlösung: 1,0 g Hefeextrakt; 1,0 g Beef-Extrakt; 2,0 g Tryptose mit dest. Wasser ad 1000 ml; pH auf 7,2 eingestellt, auf 100° erwärmt, pH kontrolliert; hierauf 10 g Glucose zugeben.

Vorversuche: Sie wurden jeweils in 2–6 100-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 20 ml Nährlösung und mit 4–7 mg Substrat in 1 ml Aceton, wie oben beschrieben, ausgeführt (bei 27° auf Schüttelmaschine mit 170 U/Min.).

Aufarbeitung der Kulturansätze: Nach abgelaufener Reaktionszeit wurden die Kulturen (oder einzelne Proben) mit Methanol während 2 Std. geschüttelt, durch eine Schicht Kieselsur (Hyflo Supercel) filtriert, ausgepresst, mehrmals mit Methanol nachgewaschen, die vereinigten Filtrate im Vakuum weitgehend vom Methanol befreit, das pH auf 6–7 eingestellt, viermal mit Chloroform, zweimal mit Chloroform-Äthanol-(2:1) ausgeschüttelt, die org. Phasen über Na_2SO_4 getrocknet, vereinigt und eingedampft. Der Eindampfrückstand (Rohprodukt) wurde im Papierchromatogramm bzw. im Dünnschichtchromatogramm geprüft und weiter verarbeitet.

III. Umsetzung von Digitoxigenin (II) mit *Aspergillus oryzae* (AHLB.) COHN. – Die Umsetzung mit dem CBS-Stamm SCHOPFER lieferte in Malz-Pepton-Nährlösung bessere Resultate als in CZAPEK-Nährlösung. Nach 10–15 Tagen war das Substrat II weitgehend umgesetzt.

115 100-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 20 ml Malz-Pepton-Nährlösung wurden mit der Sporensuspension einer dreiwöchigen Kultur des CBS-Stammes SCHOPFER auf Reissnährmedium beimpft und 3 Tage inkubiert. Hierauf wurde eine Lösung von 590 mg Digitoxigenin (II) vom Smp. 239–245° in 120 ml Aceton steril zugegeben und auf der rotierenden Maschine bei 27° während 14 Tagen geschüttelt (170 U/Min.). Die Aufarbeitung der Kulturen lieferte 1,49 g Rohprodukt, das im Papierchromatogramm zwar keinen totalen, jedoch einen sehr guten Umsatz zeigte (vgl. Fig. 1). Das gesamte Rohprodukt (1,49 g) wurde in Benzol gelöst, auf eine Säule mit 18 g Al_2O_3 gegeben und hierauf mit 60 ml Lösungsmittel pro Fraktion eluiert.

Fraktionen 1–4 (eluiert mit Be und Be-Chf-(9:1)) gaben 134 mg amorphes Material, KEDDE-Reaktion negativ; verworfen.

Fraktion 5 (39 mg, eluiert mit Be-Chf-(9:1); Fig. 1, Fleck A) gab aus An-Pe 10 mg 3-Dehydrodigitoxigenin (I) vom Smp. 195–211°.

Fraktion 6 (253 mg, eluiert mit Be-Chf-(9:1); Fig. 1, Flecke A + B) gab aus An-Pe 70 mg Kristallgemisch von 3-Dehydrodigitoxigenin (I) und Digitoxigenin (II) vom Smp. 168–186°.

Fraktionen 7–17 (eluiert mit Be-Chf-(9:1), -(5:1), -(4:1), -(2:1), -(1:2), Chf) gaben 264 mg amorphes Material (bestehend aus den Flecken A, B und C). Weiter nicht verarbeitet.

Fraktionen 18–24 (207 mg, eluiert mit Chf, Chf + 0,5% Me; Fig. 1, Fleck D + ganz wenig F) gaben aus An-Ae 131 mg rohes krist. 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) vom Smp. 205–265°.

Fraktionen 25–27 (eluiert mit Chf-Me-(99:1), -(98:2), -(95:5)) gaben 43 mg amorphes Material (Fig. 1, Flecke (D + F), F, resp. $F_1 + F_2$ in Fig. 2).

Fraktionen 28 und 29 (eluiert mit Chf-Me-(95:5) und -(9:1)) gaben 7 mg amorphes Material; KEDDE-Reaktion negativ; verworfen.

Aus weiteren Ansätzen wurde gelegentlich in Spuren eine weitere Substanz vom Smp. 208–214° (= Substanz A.G. 5) isoliert, die bisher nicht identifiziert werden konnte. Sie zeigte eine positive KEDDE-Reaktion und lief in den Papierchromatogrammen wesentlich langsamer als Digitoxigenin (II) und 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI).

Wurde die mikrobiologische Reaktion in einer Schüttelente vorgenommen, so erfolgte keine Umsetzung.

IV. Umsetzungen mit *Rhizopus arrhizus* FISCHER. – 1. *Digitoxigenin* (II). Während der Stamm ATCC 11145 in Malz-Pepton-Nährlösung auch nach 21 Tagen keine Umsetzung bewirkte, zeigte der gleiche Stamm in Kartoffel-Dextrose-Nährlösung schon nach 6 Tagen Reaktionszeit eine Umwandlung, die aber auch nach 21 Tagen immer noch zu keinem totalen Umsatz

führte. Die CBS-Stämme LENDNER und LINDNER erzeugten indessen eine totale Umwandlung manchmal schon innerhalb von 7 Tagen.

Eine Kultur des CBS-Stammes LENDNER wurde vom Reismährmedium auf die Kartoffel-Dextrose-Nährlösung überimpft (Inkubationszeit 4 bzw. 9 Tage). Eine Lösung von 565 mg Digitoxigenin (II) vom Smp. 239–245° in 130 ml Aceton wurde auf 123 100-ml-ERLENMEYER-Kolben (mit je 20 ml Kulturlösung) steril verteilt. Weitere 360 mg II, in 75 ml Aceton gelöst, wurden gleicherweise auf 38 300-ml-ERLENMEYER-Kolben (mit je 60 ml Kulturlösung) verteilt. Hierauf wurde auf der rotierenden Maschine (190 U/Min.) geschüttelt. Aufarbeitung erfolgte nach 18 Tagen (100-ml-Kulturgefäße) bzw. nach 20 Tagen (30 300-ml-Kulturgefäße) bzw. nach 34 Tagen (8 300-ml-Kulturgefäße). Es resultierten insgesamt 1,55 g Rohprodukt. Im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 3) zeigte sich ein nahezu totaler Umsatz. Das Rohprodukt wurde in Benzol-Chloroform-(1:1) gelöst, auf eine Säule mit 30 g Al_2O_3 gegeben und mit je 100 ml Lösungsmittel pro Fraktion eluiert.

Fraktion 1 (eluiert mit Be-Chf-(1:1)) gab 22 mg amorphes Material, KEDDE-Reaktion negativ; verworfen.

Fraktion 2 (eluiert mit Be-Chf-(1:1)) gab 505 mg rotes, dickes Öl (Fig. 3, Fleck A + wenig B).

Fraktionen 3–7 (366 mg, eluiert mit Be-Chf-(1:3), Chf; Fig. 3, Fleck D) gaben aus Me-Ae-(Pe) 45 mg rohes krist. 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) vom Smp. 252–264° und 21 mg vom Smp. 210–222°.

Fraktionen 8–15 (eluiert mit Chf, Chf+0,5% Me, Chf +1% Me) gaben 59 mg amorphes Material (Fig. 3, Fleck D+E+ wenig F).

Fraktionen 16–24 (138 mg, eluiert mit Chf-Me-(98:2), -(97:3), -(95:5), -(9:1); Fig. 3, Fleck F) gaben aus An-Ae 51 mg rohes krist. Monohydroxydigitoxigenin IV (Substanz G.J. 3) vom Smp. 210–226°.

Fraktionen 25–27 (eluiert mit Chf-Me-(9:1), -(1:1), Me) gaben 33 mg amorphes Material, KEDDE-Reaktion negativ; verworfen.

Die Fraktionen 3 und 8 und die Mutterlaugen der Fraktionen 4–7 (insgesamt 241 mg) wurden nochmals analog an 7,5 g Al_2O_3 chromatographiert. Es resultierten 3,2 mg Rohprodukt (eluiert mit Be-Chf-(4:1)), das den reinen Fleck A zeigte (vgl. Fig. 3), der jedoch aus den 2 Komponenten A_1 und A_2 besteht (vgl. Fig. 4). A_1 und A_2 sind verschieden von 3-Dehydrodigitoxigenin (I). Nicht identifiziert. Ferner wurden noch 53 mg rohes krist. 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) vom Smp. 195–236° erhalten (eluiert mit Be-Chf-(2:3) und Chf).

Wurde die Reaktion in 500-ml-ERLENMEYER-Kolben, die mit einer Schikane versehen waren, vorgenommen, so erfolgte keine Umsetzung, wahrscheinlich infolge zu starker Turbulenz. Ebensovienig erfolgreich war die Umsetzung in einer Schüttelente.

2. 3-O-Formyl-digitoxigenin (III). Versuche mit den CBS-Stämmen LENDNER und LINDNER in Kartoffel-Dextrose-Nährlösung zeigten, dass innerhalb von 3 Tagen eine totale Deformylierung erzielt worden war und dass das gebildete Digitoxigenin (II) fortwährend zu 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) (Fleck D) und zum Hydroxydigitoxigenin IV (Fleck F) (vgl. Fig. 3) umgesetzt wurde.

V. Umsetzung von Digitoxigenin (II) mit *Trichothecium roseum* LINK (*Cephalothecium roseum* CDA.). – Vorversuche mit dem CBS-Stamm CAIN in Malz-Nährlösung und in «Sporulation-Nährlösung» zeigten, dass letztere geeigneter ist. In 14 Tagen wurden ein neuer lang-samer Fleck D und 2–3 neue schneller laufende Flecke gebildet (vgl. Fig. 5). Fleck D lief gleich wie 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) (vgl. Fig. 5 und 6).

Ein grösserer Ansatz mit 25 mg Digitoxigenin (II) in einem 500-ml-ERLENMEYER-Kolben lieferte nach 18 Tagen ein Rohprodukt, aus dem aus An-Ae direkt 5 mg Ausgangsmaterial II vom Smp. 215–235° kristallisierten. Papierchromatographie der Mutterlaugenrückstände vgl. Fig. 4 und 7 (A_2 identisch mit 3-Dehydrodigitoxigenin (I) (A_1 evtl. mit 1 16 -Digitoxigenin) und F mit Digoxigenin (VIII)).

VI. Charakterisierung der Reaktionsprodukte. – 1. 3-Dehydrodigitoxigenin (I): Kristalle aus Umsatz mit *A. oryzae* nach Smp., Misch-Smp., Laufstrecke im Papierchromatogramm (Fig. 1, Fleck A) und Farbreaktion mit 84-proz. H_2SO_4 mit authentischem Material identisch.

2. *Monohydroxydigitoxigenin IV* (Substanz G. J. 3): Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus An-Ae Prismen vom Smp. 268–276°; $[\alpha]_D^{25} = +18^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,751$ in Me). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{max} = 217 m\mu$ ($\log \epsilon = 4,1$). Farbreaktion mit 84-proz. H_2SO_4 : grün (5 Min.), braun (15–30 Min.), grünbraun (1–2 Std.), farblos (5 Std.). Laufstrecke im Papierchromatogramm vgl. Fig. 2. Trocknung zur Analyse 5 Std. bei 120° (Schweinchen).

$C_{23}H_{34}O_5$ (390,50) Ber. C 70,7 H 8,8% Gef. C 70,0⁴¹⁾ H 8,5%

3. *7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI)*: Nach mehrmaligem Umkristallisieren Prismen vom Smp. 275–280°. $[\alpha]_D^{25} = +39^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,073$ in Me); $[\alpha]_D^{25} = +36^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,110$ in Me). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{max} = 217 m\mu$ ($\log \epsilon = 4,18$). IR.-Spektrum (KBr): Banden bei 2,92 μ (OH); 5,63–5,64 μ und 5,78 μ (C=O, Butenolidring), Inflexion 5,86 μ (?); 6,14 μ (C=C, Butenolidring). Farbreaktion mit 84-proz. H_2SO_4 : blassgelb (0 Min.), zitronengelb (1 Min.), hellgrün (5 Min.), blau (20 Min.), türkis (1 Std.), blassgrün (2 Std.). Laufstrecken im Papierchromatogramm vgl. Fig. 1, 3, 5, 6 und 8. Trocknung zur Analyse 5 Std. bei 120°.

$C_{23}H_{34}O_5$ (390,50) Ber. C 70,7 H 8,8 O 20,5% Gef. C 70,2⁴¹⁾ H 9,0 O 20,7%

a) *Acetylierung*: 22 mg VI vom Smp. 251–258° wurden mit 0,5 ml abs. Pyridin und 0,4 ml Acetanhydrid während zwei Tagen bei 22° stehengelassen. Übliches Aufarbeiten mit Chf ergab 24 mg Rohprodukt, das an 0,8 g Al_2O_3 chromatographiert wurde. Die mit Be-Chf-(75:25) eluierten Fraktionen (14,2 mg) gaben aus Me-Ac 11,3 mg Kristalle vom Smp. 161–165°. Nach Umkristallisieren aus Ae-Pe *Di-O-acetyl-7 β -hydroxy-digitoxigenin (VII)* in Prismen vom Smp. 170–173°. $[\alpha]_D^{25} = +27^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,885$ in Chf). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): Banden bei 2,82 μ (OH); 5,60 μ und 5,72 μ (C=O, Butenolidring und Acetyl); 6,16 μ (C=C, Butenolidring); 8,14 μ und 8,21 μ (O–C–O, Acetat). Farbreaktion mit 84-proz. H_2SO_4 : gelblich (0 Min.), gelblich mit blauem Rand (1 Min.), gelblich mit violetterm Rand (3 Min.), violett (5 Min.), violett mit blauem Rand (11 Min.), blassblau (25 Min.), blassblau-grün (40 Min.), farblos (1 Std.). Papierchromatogramm: Rf-Wert = 0,58 im System Pe-Be-(4:1)/Fmd. Zur Analyse 5 Std. bei 100° getrocknet.

$C_{27}H_{38}O_7$ (474,57) Ber. C 68,3 H 8,1% Gef. C 68,1 H 7,9%

b) *Prüfung von VII gegen CrO_3* . – α) *Mit CrO_3 - H_2SO_4 in Aceton*: Eine Lösung von 26 mg VII in 10 ml Aceton wurde mit 0,06 ml CrO_3 - H_2SO_4 -Lösung (Lösung: 2,67 g CrO_3 mit 2,3 ml konz. H_2SO_4 versetzt und mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt) 4 Min. bei 10–15° in N_2 -Atmosphäre stehengelassen. Nach Zugabe von 12 ml Wasser wurde das An im Vakuum entfernt, die verbleibende Lösung mit Chf ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt (25 mg) wurde an 1 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Chf eluierten Fraktionen ergaben aus Ae-Pe 17 mg Kristalle. Nach Umkristallisieren aus Ae-Pe reines Ausgangsmaterial VII vom Smp. 170–173°. Misch-Smp. war gleich.

β) *Mit CrO_3 -Eisessig*: Eine Lösung von 7 mg VII in 1 ml Eisessig wurde mit 0,165 ml 2-proz. CrO_3 -Eisessig-Lösung 6 Std. bei 22° stehengelassen. Nach Zugabe von 0,1 ml Me und Stehen während 20 Std. wurde wie üblich aufgearbeitet. Es resultierten 7 mg Rohprodukt, das im Papierchromatogramm nur 1 Fleck zeigte, der dem Ausgangsmaterial entsprach. Aus Ae-Pe Prismen vom Smp. und Misch-Smp. 169–172°.

c) *Oxydation von VI mit CrO_3 - H_2SO_4 in Aceton*: Eine Lösung von 29,7 mg VI (einheitliche Mutterlauge) in 10 ml Aceton wurde mit 0,07 ml CrO_3 - H_2SO_4 (siehe oben) versetzt und 4–5 Min. bei 10° in N_2 -Atmosphäre geschüttelt. Nach Zugabe von 14 ml H_2O wurde das An im Vakuum entfernt und die Lösung mit Chf dreimal ausgeschüttelt. Übliches Aufarbeiten lieferte 25,8 mg Rohprodukt. Im Papierchromatogramm 2 Flecke mit den Rf-Werten 0,17 und 0,55 (System Be/Fmd), bzw. 0,45 und 0,80 (System Be-Chf-(7:5)/Fmd). Chromatographie an 1,5 g Silicagel ergab aus den mit Chf eluierten Fraktionen nach zweimaliger Umkristallisation aus An-Ae 2,3 mg krist. *3,7-Bisdehydro-7 β -hydroxy-digitoxigenin (IX)* vom Smp. 230–236°. UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 216 $m\mu$ ($\log \epsilon = 4,11$) und 280 $m\mu$ ($\log \epsilon = 2,2$). IR.-Spektrum (KBr): Banden bei 2,86 μ (OH); 5,61 μ und 5,73 μ (C=O, Butenolidring); 5,84 μ (C=O, 6-Ringketon); 6,17 μ (C=C, Butenolidring). Im Papierchromatogramm einheitlich: schneller als VI laufender Fleck. Eine Probe von 0,6 mg IX wurde mit 0,3 ml Eisessig 30 Min. auf 110° erhitzt. Der Ein-

⁴¹⁾ Die Trocknung bei niedrigeren Temperaturen gab noch tiefere C-Werte.

dampfdruckstand zeigte im Papierchromatogramm nur unverändertes Ausgangsmaterial. Die Mutterlaugen und andere Fraktionen (12 mg) zeigten noch beide Flecke. Sie wurden an 1,2 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Chf eluierten Fraktionen gaben noch 3,3 mg reines krist. IX. Die weiteren mit Chf-Me -(99:1) und -(98:2) eluierten Fraktionen gaben aus An-Ae 2,5 mg krist. 3-Dehydro-7 β -hydroxydigitoxigenin (V) vom Smp. 259–269°. UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 216 μ ($\log \epsilon = 4,33$) und 285 μ ($\log \epsilon = 2,10$). IR.-Spektrum (KBr): Banden bei 2,95 μ (OH); 5,54 μ und 5,76 μ (C=O, Butenolidring); 5,85 μ (C=O, 6-Ringketon) und 6,19 μ (C=C, Butenolidring).

Ein aus einem weiteren Oxydationsversuch erhaltenes Präparat von 3,7-Bisdehydro-7 β -hydroxy-digitoxigenin (IX) zeigte im UV.-Spektrum neben dem Hauptmaximum bei 218 μ ($\log \epsilon = 4,10$) ein weiteres bei 260–270 μ ($\log \epsilon = 2,78$), was auf eine Verunreinigung von 6–8% $\Delta^8(14)$ -7-Keton hinweist. Das IR.-Spektrum (KBr) zeigte entsprechend Banden bei 2,80 μ (OH); 5,64 μ und 5,74 μ (C=O, Butenolidring); 5,87 μ (C=O, 6-Ringketon); 5,95 μ (C=O, α,β -ungesättigtes 6-Ringketon) und 6,14 μ (C=C, Butenolidring + α,β -ungesättigtes Keton). Im Papierchromatogramm einheitlich: langsamer als VI laufender Fleck.

d) *Behandlung mit konz. HCl bei 0°*: 7 mg VI wurden mit 1,5 ml konz. HCl in CO_2 -Atmosphäre 2,5 Std. bei 0° stehengelassen. Übliches Aufarbeiten ergab 7,5 mg Rohprodukt. UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 215 \mu$ ($\log \epsilon = 4,1$). Ein Parallelversuch mit Gitoxigenin ergab ein Rohprodukt mit den erwarteten Maxima (Äthanol) bei 221 μ ($\log \epsilon = 4,06$) und 334 μ ($\log \epsilon = 4,19$).

e) *Behandlung mit Eisessig bei 110°*: 1,5 mg VI wurden mit 0,5 ml Eisessig 6,5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde im Papierchromatogramm verfolgt. Nach 30 Min. wurde ein neuer schneller laufender Fleck mit dem Rf-Wert 0,65 (Rf-Wert von VI: 0,1) im System Be/Fmd sichtbar. Nach weiteren 3 Std. und nach 6,5 Std. war der neue Fleck verstärkt, jedoch immer noch Ausgangsmaterial VI sichtbar.

f) *Behandlung mit HCl-Eisessig bei 110°*: 20 mg VI wurden mit 3 ml Eisessig und 0,2 ml konz. HCl 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Eindampfen im Vakuum wurde das Rohprodukt (17 mg) an 0,6 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Be-Ae-(1:1), Ae, Ae-Chf-(95:5), -(9:1) und -(4:1) eluierten Fraktionen (8 mg) zeigten im Dünnschichtchromatogramm (System: Chf-An-(3:1)) 2 Flecke mit den Rf-Werten 0,5 und 0,7. Aus An-Ae-Pe 4,3 mg krist. Anhydro-7 β -hydroxydigitoxigenin (X) vom Smp. 208–213°. Im Dünnschichtchromatogramm nur der Fleck mit dem Rf-Wert 0,5 sichtbar. UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 203 μ ($\log \epsilon = 4,1$); 214 μ ($\log \epsilon = 4,1$) und Schulter bei 272 μ ($\log \epsilon = 2,44$). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2): Banden bei 2,80 μ (OH); 5,61 μ und 5,72 μ (C=O, Butenolidring); 5,79 μ (?); und 6,14 μ (C=C, Butenolidring + $\Delta^{8,14}$ bzw. Δ^{14}).

g) *Behandlung mit SOCl_2 -Pyridin*: Eine Lösung von 42 mg VI in 2 ml alkoholfreiem Chf und 0,4 ml Pyridin wurde bei –15° mit 0,3 ml frisch dest. SOCl_2 versetzt und das Gemisch 1 Std. bei –15°, dann noch 2 Std. bei 22° stehengelassen. Nach Zerlegen mit Eis wurde mit Chf ausgeschüttelt. Das weitere übliche Aufarbeiten ergab 40 mg Rohprodukt, das im Papierchromatogramm nur einen neuen Fleck zeigte, der rascher als VI wanderte. Das Rohprodukt wurde an 1,2 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Chf eluierten Fraktionen (26 mg) gaben aus An-Me 11 mg Kristalle vom Doppel-Smp. 114–117°/206–221°. Nach Umkristallisieren aus An-Me 7,14-Cyclo-sulfat XI in Nadeln vom Smp. 210–215° oder in Blättchen vom Smp. 114–117°. $[\alpha]_D^{25} = +26^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,825$ in Chf). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 214 \mu$ ($\log \epsilon = 4,21$), Schulter bei 280 μ ($\log \epsilon = 2,25$). IR.-Spektrum vgl. Fig. 11. Mit Tetranitromethan in Chf keine Gelbfärbung. BEILSTEIN-Probe auf Halogen positiv. Zur Analyse 3 Std. bei 100° getrocknet.

$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{S}$ (455,00) Ber. C 60,6 H 6,9 O 17,6% Gef. C 61,3 H 7,1 O 18,7%

ZUSAMMENFASSUNG

Inkubation von Digitoxigenin (II) mit Kulturen von *Aspergillus oryzae* (AHLB.) COHN ergab 3-Dehydrodigitoxigenin (I), das noch unbekannte 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI), die isoliert wurden, sowie Spuren von 2 nicht identifizierten Cardenoliden.

Der Umsatz von II mit *Rhizopus arrhizus* FISCHER führte zu mindestens 5 Reak-

tionsprodukten, von denen 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) und ein weiteres unbekanntes monohydroxyliertes Digitoxigeninderivat (IV) kristallisiert wurden.

Nach Inkubation mit *Trichothecium roseum* LINK (*Cephalothecium roseum* CDA.) wurden 3-Dehydrodigitoxigenin (I), 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI), Digoxigenin (VIII) (kein Sarmetogenin) und ein weiteres nicht identifiziertes Cardenolid nachgewiesen.

Die Konstitution von 7 β -Hydroxydigitoxigenin (VI) wird bewiesen.

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

129. Auf das Zentralnervensystem wirkende Substanzen XXV¹⁾ Reaktionen der α -substituierten β -Lactone II²⁾. Eine neue allgemeine Synthese α -substituierter Propionsäuren und deren Derivate

von Bruno J. R. Nicolaus, Luigi Mariani und Emilio Testa

(19. IV. 61)

Im Rahmen einer Untersuchung über Substanzen, die potentiell auf das Zentralnervensystem wirksam sind, haben wir vor kurzem eine neue und allgemeine Synthese der α -mono- und α, α -disubstituierten β -Propiolactone beschrieben^{3) 4) 5)}. Durch Diazotierung bei 0 bis + 5° in verd. Essigsäure werden nämlich die leicht erhältlichen α -substituierten β -Amino-propionsäuren I einfach und in guter Ausbeute in die β -Lactone II übergeführt, welche je nachdem ob sie Alkyl- oder Aryl-Substituenten tragen, als farblose oder leicht gelbgefärbte Öle anfallen, die die Schleimhaut stark reizen.

Diese Verbindungen, über welche ZAUGG⁶⁾ vor kurzem eine zusammenfassende Arbeit veröffentlicht hat, haben wir auch direkt aus den α -substituierten β -Hydroxypropionsäuren durch Behandeln mit Thionylchlorid und Pyridin erhalten⁵⁾. Eine zum selben Ergebnis führende Wasserabspaltung mit Hilfe von Cyclohexylcarbodiimid ist SHEEHAN gelungen⁷⁾.

Die β -Lactone bilden sehr interessante Ausgangsprodukte für die Synthese neuer und sonst schwer zugänglichen Verbindungen^{2) 8)}; ausgehend von ihnen kann man insbesondere funktionelle Derivate von Funktionen erhalten, welche an einem quartären Kohlenstoffatom sitzen und bekanntlich äusserst träge sind.

Eine sehr interessante Umsetzung der α -mono- und α, α -disubstituierten β -Lactone besteht in ihrer Umwandlung durch Chlor- bzw. Bromwasserstoff in die entsprechen-

¹⁾ XXIV. Mitt.: E. TESTA & L. FONTANELLA, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

²⁾ I. Mitt.: B. J. R. NICOLAUS, L. MARIANI, G. G. GALLO & E. TESTA, J. org. Chemistry, im Druck.

³⁾ E. TESTA, L. FONTANELLA, G. F. CRISTIANI & F. FAVA, Liebigs Ann. Chem. 619, 47 (1958).

⁴⁾ E. TESTA, L. FONTANELLA, G. F. CRISTIANI & L. MARIANI, Liebigs Ann. Chem. 639, 166 (1961).

⁵⁾ E. TESTA, L. FONTANELLA & L. MARIANI, J. org. Chemistry 25, 1812 (1960).

⁶⁾ H. E. ZAUGG, Organic Reactions, Bd. VIII, S. 305, London 1954.

⁷⁾ J. C. SHEEHAN, K. HASSPACHER & Y. LIEH YEH, J. Amer. chem. Soc. 81, 6086 (1959).

⁸⁾ E. TESTA, L. FONTANELLA, G. F. CRISTIANI & G. G. GALLO, J. org. Chemistry 24, 1928 (1959); G. MELONE, A. VECCHI, G. PAGANI & E. TESTA, *ibid.* 25, 859 (1960).