

NEUE BEITRÄGE ZUR BIOGENESE DER CARDENOLIDE IN *DIGITALIS LANATA**

RUDOLF TSCHESCHE, RUDOLF HOMBACH, HEINZ SCHOLTEN und MICHAEL PETERS

Aus dem Institut für Organische und Biochemie der Universität Bonn, Germany

(Eingegangen am 16 October 1969)

Abstract— 5β H-pregnane- 3β -ol-20-one and 5β H-pregnane-3,20-dione are interconvertible after administration to *Digitalis lanata* plants and form digitoxigenin, digoxigenin and gitoxigenin. 5α H-pregnane- 3β -ol-20-one did not give uzarigenin. 5β H- Δ^{14} -pregnene- 3β -ol-20-one is not a precursor for digitoxigenin whereas 5β , 14β H-pregnane- 3β -ol-20-one is, but only to a very small extent. 5β H-pregnane- 3β , 12β -diol-20-one is converted in good yield to digoxigenin as was digitoxigenin.

EINFÜHRUNG

BENNETT und Mitarb.² haben mit *Digitalis lanata* gezeigt, dass Progesteron ausser den Cardenoliden Digitoxigenin, Digoxigenin und Gitoxigenin auch die 21 C-Steroid-Derivate 5α H - Pregnandion - 3,20, 5β H - Pregnandion-3,20, 5α H - Pregnanol - 3β -on - 20 und Δ^5 - Pregnenol- 3β -on-20 bildet. Es interessierte die Frage, wie weit diese Pregnanderivate noch zur Biogenese der Cardenolide herangezogen werden können. Dazu wurden durch Marker-Abbau die Spirostanole Smilagenin (5β H) und Tigogenin (5α H) in die an C-5 isomeren Δ^{16} -Pregnenol- 3β -on-20-derivate umgewandelt, die durch Reduktion mit 3 H an C-16 und C-17 radioaktiv markiert werden konnten. Durch Oxydation liess sich aus dem zugehörigen Alkohol auch das 5β H-Pregnandion-3,20 gewinnen, dessen biochemische Beziehung zum entsprechenden 3β -ol-Derivat von Interesse war. Mit dem 5α H-Pregnanol- 3β -on-20 bestand ferner die Möglichkeit zu prüfen, ob Digitalis-Pflanzen es in Uzarigenin überführen können.

Ein weiteres Problem der Cardenolidbiogenese ist die Klärung des Mechanismus der Hydroxylierungen im Steroidgerüst, vornehmlich an C-14. Bekannt ist, dass die 14α H-Pregnanderivate Δ^5 -Pregnenol- 3β -on-20,³ sowie Progesteron⁴ in 14β -OH-Derivate übergehen. Von Caspi und Mitarb.⁵ wird die Hypothesen diskutiert, dass hierbei als Zwischenstufe ein 14β , 15β -Epoxid auftritt, das als solches aber bisher als Vorläufer für Digitoxigenin nicht geprüft wurde. Die Autoren zeigten nur, dass zwar 4 - 14 C-Progesteron, nicht aber 1 - 3 H- 14α -Hydroxyprogesteron in Digitoxigenin übergehen, wenn sie zusammen verabreicht werden, ersteres in einer Ausbeute von ca. 2%. Die Nichtverwertung des 14α -Hydroxyprogesterons kann damit interpretiert werden, dass ein Umklappen in die in den Cardenoliden vorkommende 14β -OH-Struktur bei ihm nicht möglich ist. Damit steht im Einklang, dass

* Zur Biosynthese von Steroidderivaten im Pflanzenreich 13.Mitt.: Titl 12 siehe Ref. 1.

¹ R. TSCHESCHE, R. FRITZ und G. JOSST, *Phytochem.* **9**, 371 (1970).

² R. D. BENNETT, H. H. SAUER und E. HEFTMANN, *Phytochem.* **7**, 41 (1968).

³ R. TSCHESCHE und G. LILIENWEISS, *Z. Naturforsch.* **19b**, 266 (1964).

⁴ E. CASPI und G. M. HORNBY, *Phytochem.* **7**, 423 (1968).

⁵ E. CASPI und D. O. LEWIS, *Phytochem.* **7**, 683 (1968).

wie wir zeigen konnten, sowohl das $5\beta\text{H-Pregnan-}3\beta,14\beta\text{-on-}20$),⁶ wie das $5\beta\text{H-Pregnan-}3\beta,14\beta,21\text{-on-}20$ ⁷ in Digitoxinin umgewandelt werden. Wir haben nunmehr auch das $5\beta\text{H},14\beta\text{H-Pregnan-}3\beta\text{-on-}20$ und das $5\beta\text{H-}\Delta^{14}\text{-Pregnen-}3\beta\text{-on-}20$ radioaktiv markiert hergestellt und es an Digitalis-Pflanzen verabreicht.

Schliesslich war schon bekannt, dass Digitoxinin (7) von Digitalis-Pflanzen an C-12 β zu Digoxigenin (6) hydroxyliert wird, während dabei jedoch kaum Gitoxigenin gefunden werden konnte. Es blieb zu prüfen, ob eine Hydroxylierung an C-14 auch auf der Stufe des $5\beta\text{H-Pregnan-}3\beta,12\beta\text{-on-}20$ möglich ist. Hierfür wurde ein in 12 α mit ^3H markiertes Material verwendet.

ERGEBNISSE

Die nachfolgende Tabelle 1 gibt die erhaltenen Ergebnisse mit $5\beta\text{H-Pregnan-}3\beta\text{-on-}20$ (16, 17 ^3H) (= A) $5\beta\text{H-Pregnan-}3,20$ (16, 17 ^3H) (= B) und $5\alpha\text{H-Pregnan-}3\beta\text{-on-}20$ (16, 17 ^3H) (= C) wieder.

TABELLE 1.

Angebotener* Precursor	$5\beta\text{-H-Pregnan-}3\beta\text{-on-}20$ A	$5\beta\text{-H-Pregnan-}3,20$ B	$5\alpha\text{-H-Pregnan-}3\beta\text{-on-}20$ C
Applikationszeit	September	September	November
Applikationsdauer (Tage)	20	21	24
Angebote	$6 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$1,43 \cdot 10^8$
Radioaktivität (Imp/min)			
Abgewaschene Aktivität (Imp/min (%))	$1,6 \cdot 10^8$ (26,7%)	$1,2 \cdot 10^8$ (16,6%)	$5,7 \cdot 10^7$ (40%)
Aktivität in den Pflanzen (Imp/min (%))	$1,0 \cdot 10^8$ (17%)	$1,52 \cdot 10^8$ (21%)	$2,18 \cdot 10^7$ (16%)
	M_z † M_a †	M_z M_a	
Digitoxinin	5,4% 1,2%†	4,9% 1,3%	
Gitoxigenin	0,24% 0,05%	0,61% 0,15%	
Digoxigenin	0,3% 0,06%	0,42% 0,1%	
Uzarinin			< 0,01%
Pregnan-3,20	4,1% 0,9%		
Pregnan-3 β -on-20		1,35% 0,33%	
Alter der Pflanzen (Monate)	ca. 8	ca. 8	ca. 10

* Menge Substanz pro Pflanze, 1 mg.

$$\dagger \quad M_z = \frac{A}{A_z - A_w} \cdot 100 \quad \text{und} \quad M_a = \frac{A}{A_a - A_w} \cdot 100$$

Dabei ist A die Aktivität des angebotenen Stoffwechselproduktes, A_z die zurückgewonnene Aktivität, A_w die von der Blattoberfläche vor der Aufarbeitung abgewaschene Aktivität.

† Bei einem anderen Versuch wurde ein M_a -Wert von 0,56% gefunden.

⁶ R. TSCHESCHE, H. HULPKE und H. SCHOLTEN, *Z. Naturforsch.* 22b, 677 (1967).

⁷ R. TSCHESCHE, R. BECKER und R. HOMBACH, *Z. Naturforsch.* 23b, 1615 (1968).

Zur besseren Vergleichsmöglichkeit der Metabolisierungsraten wurden in die Tabellen 1 und 2 die Begriffe M_z und M_a eingeführt (Begriffsbestimmung unter Tabelle 1), da bei den mit ^3H markierten Verbindungen ein Verlust von ca. 50% der angebotenen Aktivität im Pflanzenversuch beobachtet wurde. M_z gibt das Verhältnis des jeweiligen Stoffwechselproduktes zur Gesamtaktivität in der Pflanze wieder. M_a bezeichnet den Anteil des aufgenommenen Vorläufers der in das jeweilige Stoffwechselprodukt umgewandelt wird.

A wurde derart berechnet, dass die konstante Aktivität pro mg pro Min nach der Cokristallisation mit der Anzahl der eingesetzten mg multipliziert wurde.

Die vorstehende Tabelle zeigt, dass $5\beta\text{H}$ -Pregnanolon und $5\beta\text{H}$ -Pregnanolone in gleicher Weise zu den Cardenoliden der *Digitalis*-pflanze metabolisiert werden. Die gefundenen Werte liegen in derselben Grössenordnung, aus denen jedoch ein Schluss über die Reihenfolge der Metabolite nicht möglich ist. Bemerkenswert ist ferner, dass A in B und auch B in A übergehen kann. Ob die wechselseitige Umwandlung auch in der Pflanze abläuft, ist zweifelhaft, da die angebotenen Mengen sicherlich weit über normalen Werten liegen. Die Ergebnisse sprechen jedenfalls nicht gegen eine Synthesefolge: Cholesterin⁹ $\rightarrow$ 20α -Hydroxycholesterin⁵ $\rightarrow$ Δ^5 -Pregnenol- 3β -on-20³ $\rightarrow$ Progesteron⁴ $\rightarrow$ $5\beta\text{H}$ -Pregnanol- 3β -on-20 $\rightarrow$ $5\beta\text{H}$ -Pregnanol- 3β ,14 β -on-20⁶ $\rightarrow$ $5\beta\text{H}$ -Pregnantriol- 3β ,14 β ,21-on-20⁷ $\rightarrow$ Digitoxigenin. Alle diese Verbindungen sind als gut wirksame Precursor nachgewiesen, das schliesst nicht aus, dass von Stationen dieses Weges auch Nebenstrassen begangen werden, wie der Befund von Caspi und Mitarb.⁸ zeigt, die fanden, dass 21-Hydroxyprogesteron ebenfalls Digitoxigenin zu bilden vermag. Die Autoren äussern die Meinung, dass 21-Hydroxyprogesteron nicht im Hauptweg der Digitoxigeninbiogenese liegt. Wir berichten später, dass auch Digoxigenin auf 2 verschiedenen Biogenesewegen erreicht werden kann. Offenbar ist ein Teil der an der Cardenolidbiosynthese beteiligten Fermente nicht sehr streng spezifisch in Bezug auf die Substitutionen im Steroidteil ihrer Substrate.

Die gegenseitige Umwandlung von $5\beta\text{H}$ -Pregnanol- 3β -on-20 und $5\beta\text{H}$ -Pregnanolone-3,20 findet ihre Analogie in dem entsprechenden Verhalten von Cholestanol- 3β und Cholestanon-3.¹ Die Auffindung von $5\alpha\text{H}$ -Pregnanolone-3,20 und von $5\alpha\text{H}$ -Pregnanol- 3β -on-20 durch Bennett und Mitarb.² neben den analogen $5\beta\text{H}$ -Derivaten dürfte sich auch hier durch das Vorkommen einer Isomerase erklären lassen. Findet die Absättigung der Doppelbindung auf der Stufe des Δ^4 -Pregnenol- 3β -ons-20 statt, so entstehen $5\beta\text{H}$ -Derivate, wird sie vorher fermentativ nach Δ^5 verschoben, so kommt es zur Bildung von $5\alpha\text{H}$ -Verbindungen.

Nachdem Sauer, Bennett und Heftmann¹⁰ bei *Strophanthus kombé* nach Anbieten von radioaktiven $5\alpha\text{H}$ -Pregnanol- 3β -on-20 das Ring A/B trans verknüpfte Cardenolid Uzarigenin in einer Ausbeute von 0,081% erhalten haben, schien es notwendig, diesen Versuch an *Digitalis lanata* Pflanzen zu wiederholen, Uzarigenin ist normalerweise in *S. kombé* nicht enthalten. Es konnte jedoch bei *D. lanata* kein Uzarigenin gefunden werden, (vergl. Tabelle I unter C) es sei denn das eine Menge unter 0,01% entstand. Ferner wurde mit Δ^5 -Pregnenol- 3β -on-20 der frühere Befund überprüft,³ das aus seinem Glucosid Xysmalogenin entstanden sei. Diese Beobachtung konnte nicht wiederholt werden. Die damals nicht durchgeführte Cokristallisation mit authentischem Xysmalogenin lieferte jetzt ein völlig negatives Ergebnis.

Nach Caspi und Lewis⁵ soll die Einführung der β -ständigen OH-Gruppe an C-14 in den ersten Stufen nach (1-4) ablaufen (Abb. 1).

⁸ E. CASPI, J. A. F. WICKRAMASINGHE und D. O. LEWIS, *Biochem. J.* **108**, 499 (1968).

⁹ E. CASPI, D. O. LEWIS, D. M. PIATAK, K. V. THIMANN und A. WINTER, *Experientia Basel* **XXII**, 506 (1966).

¹⁰ H. H. SAUER, R. D. BENNETT und E. HEFTMANN, *Phytochem.* **8**, 69 (1969).

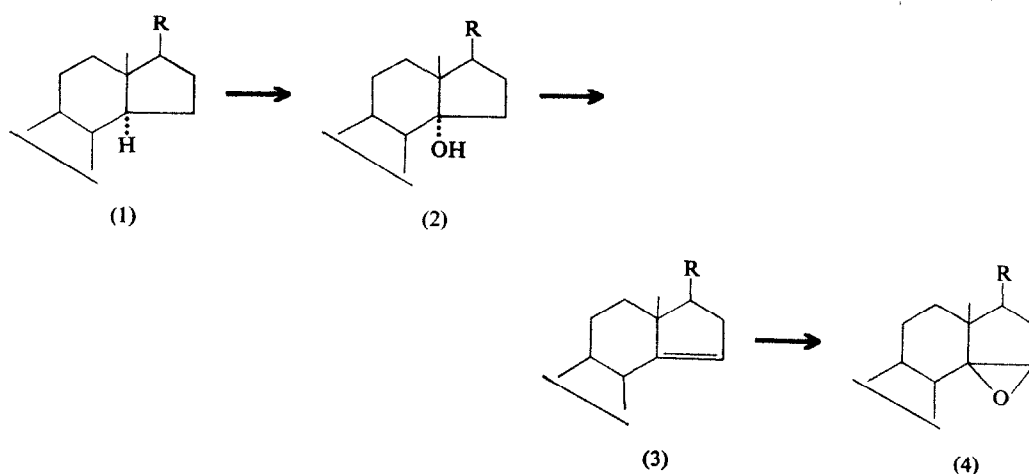


ABB. 1. EINFÜHRUNG DER β -STÄNDIGEN-OH GRUPPE AN C-14.

Die Verbindung vom Typ 2 ist von Caspi und Mitarb. in Gestalt des 14α -Hydroxyprogesterons bereits an *D. lanata* Pflanzen geprüft und in der Cardenolidbiogenese als unwirksam befunden worden.⁵ Wir haben eine Verbindung vom Typ 3 und zwar das 5β H- Δ^{14} -Pregnen-ol- 3β -on-20 an C-16 und C-17 mit ^3H markiert dargestellt und an der gleichen Pflanze geprüft. Es erwies sich ebenfalls als nicht aktiv. Dies spricht nicht für die Vorstellungen von Caspi und Mitarb. Weiter haben wir die Verbindung $5\beta,14\beta$ H-Pregnanol- 3β -on-20 (5), markiert ebenfalls an C-16 F mit ^3H , Digitalis angeboten. Hierbei wurde ein Einbau von 0,18 % in Digitoxigenin beobachtet, gegenüber einer normalen Einbaurrate bei gut aktiven Verbindungen von 1,5–2,5 %. Dieser Befund spricht dagegen, dass die Erklärung Substanz eine wesentliche Zwischenstufe auf dem Wege zum Digitoxigenin darstellt. Eine dafür, dass sie eine Wirksamkeit überhaupt aufweist, können wir nicht geben.

Schliesslich wurde die Frage untersucht, ob eine Hydroxylierung an C-12 in β -Stellung (Biogenese des Digoxigenins Abb.2 (6)) allein auf der Stufe des Digitoxigenins (D) (7) möglich ist⁷ oder aber auch ein in Stellung 12 bereits hydroxyliertes Pregnanderivat noch an C-14 hydroxyliert werden kann. Hierzu wurde 12α ^3H - 5β H-Pregnandiol- $3\beta,12\beta$ -on-20 (E) (8) hergestellt, die mit ihm erhaltenen Ergebnisse an der Pflanze gibt die Tabelle 2 wieder. (Zur Herstellung von $22\text{-}^{14}\text{C}$ -Digitoxigenin siehe⁷ und den experimentellen Teil dieser Arbeit.)

Die Befunde lassen keinen Zweifel darüber, dass eine Hydroxylierung an C-12 auf der Cardenolid-Stufe möglich ist, dass aber auch schon eine Hydroxylierung an C-14 (β) auf der Pregnanstufe geschehen kann, nachdem die OH-Gruppe an C-12 (β) schon eingeführt ist. Eine Zweigleisigkeit der Digoxigenin-biogenese ist daher nicht auszuschliessen. Dagegen scheint eine wesentliche Hydroxylierung an C-16 nur auf der 21 C-Stufe stattzufinden, da aus Digitoxigenin nur in einem von 3 unter verschiedenen Bedingungen vorgenommenen Versuchen, Gitoxigenin mit einer Metabolisierungsrate von 0,12 % erhalten werden konnte.⁶

Die Metabolisierungsraten der im Dezember und Januar durchgeführten Versuche liegen bedeutend niedriger als diejenigen des Aprils. Auf diese jahreszeitlichen Schwankungen im Umsatz hat auch schon Matas¹¹ hingewiesen.

¹¹ L. C. MATAS, *Ann. Real. Acad. Farm.* **26**, 371 (1960).

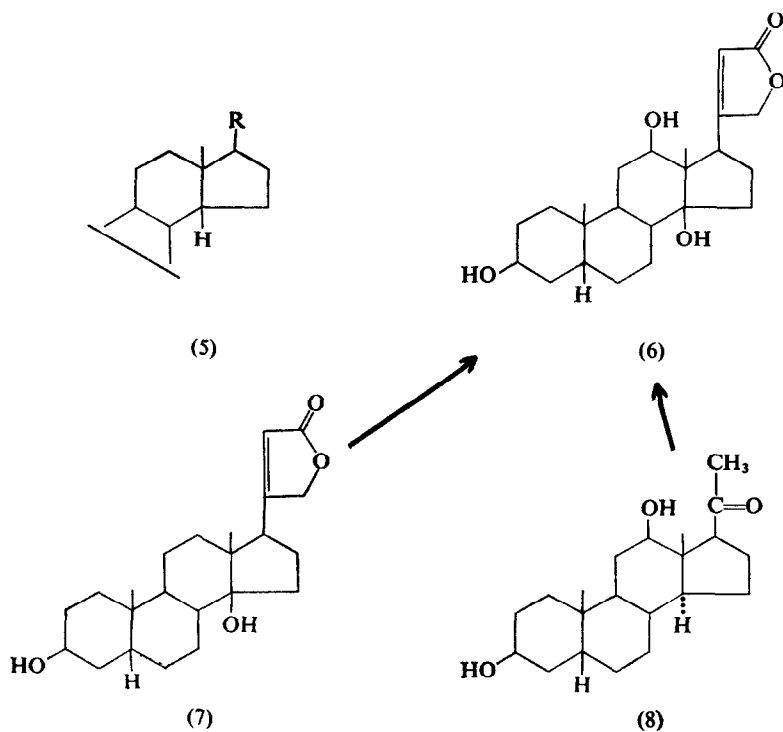


ABB 2. BIOGENESE DES DIGOXIGENINS.

TABELLE 2.

Angebotener* Precursor	22- ¹⁴ C-Digoxigenin <i>D</i>		12 α - ³ H-5 β H-Pregnandiol-3 β ,12 β -on-20 <i>E</i>			
Applikationszeit	Januar	April, Mai	Dezember	April		
Applikationsdauer (Wochen)	3	8	3	3		
Angebote	11·10 ⁶	11·10 ⁶	5,5·10 ⁷	3,07·10 ⁷		
Aktivität (Imp/min)						
Menge Substanz pro Pflanze (mg)	1,5	1,5	1,25	0,8		
Abgewaschene	7,1·10 ⁶ (64,5%)	6,1·10 ⁶ (53%)	10,7·10 ⁶ (19,7%)	8,6·10 ⁶ (25%)		
Aktivität (Imp/min (%))						
Aktivität in den Pflanzen (Imp/min (%))	1,62·10 ⁶ (14,7%)	2,6·10 ⁶ (24%)	3,9·10 ⁶ (7,1%)	3,5·10 ⁶ (11%)		
	<i>M_z</i> * <i>M_a</i>	<i>M_z</i> <i>M_z</i>	<i>M_z</i> <i>M_a</i>	<i>M_z</i> <i>M_a</i>		
Digoxigenin	0,43% 0,17%	0,84% 0,43%	0,55% 0,04%	2,42% 0,39%		
Alter der Pflanzen (Monate)	8	11	6	10		

* Siehe Tabelle 1.

Herstellung der Versuchssubstanzen

Die in 16α und 17α ^3H markierten $5\beta\text{H}$ -Pregnanol- 3β -on-20 und $5\beta\text{H}$ -Pregnandion-3,20, sowie das 5α -Pregnanol- 3β -on-20 wurden durch Abbau nach Marker¹² aus Smilagenin ($5\beta\text{H}$) bzw. Tigogenin ($5\alpha\text{H}$) hergestellt. Das primäre Abbauprodukt in Form des Δ^{16} -Pregnen-derivates, acetyliert am 3β OH, wurde mit KOH in tert. Butanol verseift und das Hydrolysenprodukt mit ^3H hydriert (ausgeführt vom Radiochemical Centre, Amersham, England). Das $16\alpha,17\alpha$ - ^3H - $5\beta\text{H}$ -Pregnandion-3,20 wurde durch Jones-Oxydation aus dem entsprechenden 3β -ol-Derivat erhalten.

Das in 16α tritylierte $5\beta,14\beta\text{H}$ -Pregnanol- 3β -on-20 liess sich aus dem Marker-Abbauprodukt des Smilagenins (Δ^{16} ungesättigt) durch Dehydrieren mit Bromsuccinimid zum $\Delta^{14,16}$ -Dien und Umsetzen mit Persäure in das Δ^{16} -Pregnenol- 3β -oxido-14,15-on-20 umwandeln,¹³ dessen Doppelbindung Δ^{16} mit ^3H und Pt-Katalysator abgesättigt wurde. Die Umlagerung des hierbei primär entstehenden 17α -Isomeren in Bezug auf die Seitenkette gelang mit methanol. KOH,¹⁴ hierbei blieb nur die Markierung an C- 16α erhalten.

Diese Verbindung liess sich nach Öffnung der Oxid ringes mit Thionylchlorid in Pyridin bei 0° in Δ^{14} - $5\beta\text{H}$ -Pregnenol- 3β -on-20 überführen,¹⁵ enthält daher an C-16 ebenfalls eine Markierung durch ^3H .

Die Synthesen des 12α - ^3H - 5β -H-Pregnandiol- $3\beta,12\beta$ -on-20 und 5β -H-Pregnandiol- $3\alpha,12\alpha$ -on-20 wurde wie folgt durchgeführt: 5β -H-Pregnandiol- $3\beta,12\beta$ -on-20 war bisher nicht bekannt, dagegen ist das $3\alpha,12\alpha$ -Epimere durch Abbau der Desoxycholsäure erhalten worden.

Für die Synthese des $3\beta,12\beta$ -Diols bot sich ebenfalls Desoxycholsäure an, da in ihr schon eine A/B cis-Verknüpfung vorliegt. Dagegen musste die Konfiguration der Hydroxygruppen an C-3 und C-12 umgekehrt werden. Dies liess sich nach einer Methode von Chang u. Mitarb.¹⁶ durchführen. Gleichzeitig ergab sich dabei die Möglichkeit ^3H während des Syntheseweges direkt einzuführen. Die Abspaltung der Seitenkette wurde dann nach dem Verfahren von Meystre-Miescher¹⁷ durchgeführt, das für die analoge $3\alpha,12\alpha$ -Verbindung (Desoxycholsäure) schon verwendet worden ist.

Ausgegangen wurde vom Desoxycholsäuremethylester (9) (Abb. 3), der in Pyridin mit *p*-Toluolsulfochlorid das 3α -Tosylat (10) ergab. Durch nucleophile Substitution an C-3 mit *N,N*-Dimethylformamid konnte (10) in das 3β -Formiat (11) übergeführt werden. Dabei trat zu etwa 20% Eliminierung zum Δ^3 -Cholenat ein. Beide Verbindungen liessen sich chromatographisch trennen. Das 3β -Formiat wurde mit Kaliumbichromat oxydiert und anschliessend mit verdünnter HCl zum Methyl- 3β -hydroxy-12-ketocholanat (12) verseift. Das Keton (12) mit Raney-Nickel als Katalysator im Autoklaven hydriert, ergab die beiden an C-12 epimeren Ester, die sich an Kieselgel im System Chloroform/Aceton trennen liessen. Bei der Reduktion erhielt man etwa 60% der 12β -Verbindung (13). (I.R.-Spektren von (13), Methyl- $3\beta,12\beta$ -dihydroxycholanat: 3600, 3460, 1720, 1000 cm^{-1} ; Methyl-desoxycholanat: 3600, 3430, 1720, 1030 cm^{-1} . Die starke Bande bei 1000 cm^{-1} ist charakteristisch für die 12β -OH Gruppe in Cholsäurederivaten. Die 12α -Epimeren absorbieren bei 1030 cm^{-1}).

¹² M. F. WALL, N. E. KENNEY und E. S. ROTHMAN, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5665 (1955).

¹³ L. RUZICKA, PL. A. PLATTNER, H. HEUSER und K. MEIER, *Helv. Chim. Acta* **30**, 1342 (1947); PL. A. PLATTNER und H. HEUSER, dgl. **29**, 727 (1946); PL. PLATTNER, L. RUZICKA, H. HEUSER und E. ANGLIKER, dgl. **30**, 390 (1947).

¹⁴ D. LENOIR, Dissertation, Univ. Bonn (1967).

¹⁵ R. TSCHESCHE, G. BRÜGMANN, H.-W. MARQUARDT und H. MACHLEIDT, *Liebigs Ann. Chem.* **648**, 185 (1961).

¹⁶ F. C. CHANG, N. F. WOOD und W. C. HOLTON, *J. Org. Chem.* **30**, 1718 (1965).

¹⁷ C. H. MEYSTRE, L. EHMAN, R. NEHER und K. MIESCHER, *Helv. Chim. Acta* **28**, 1252 (1945).

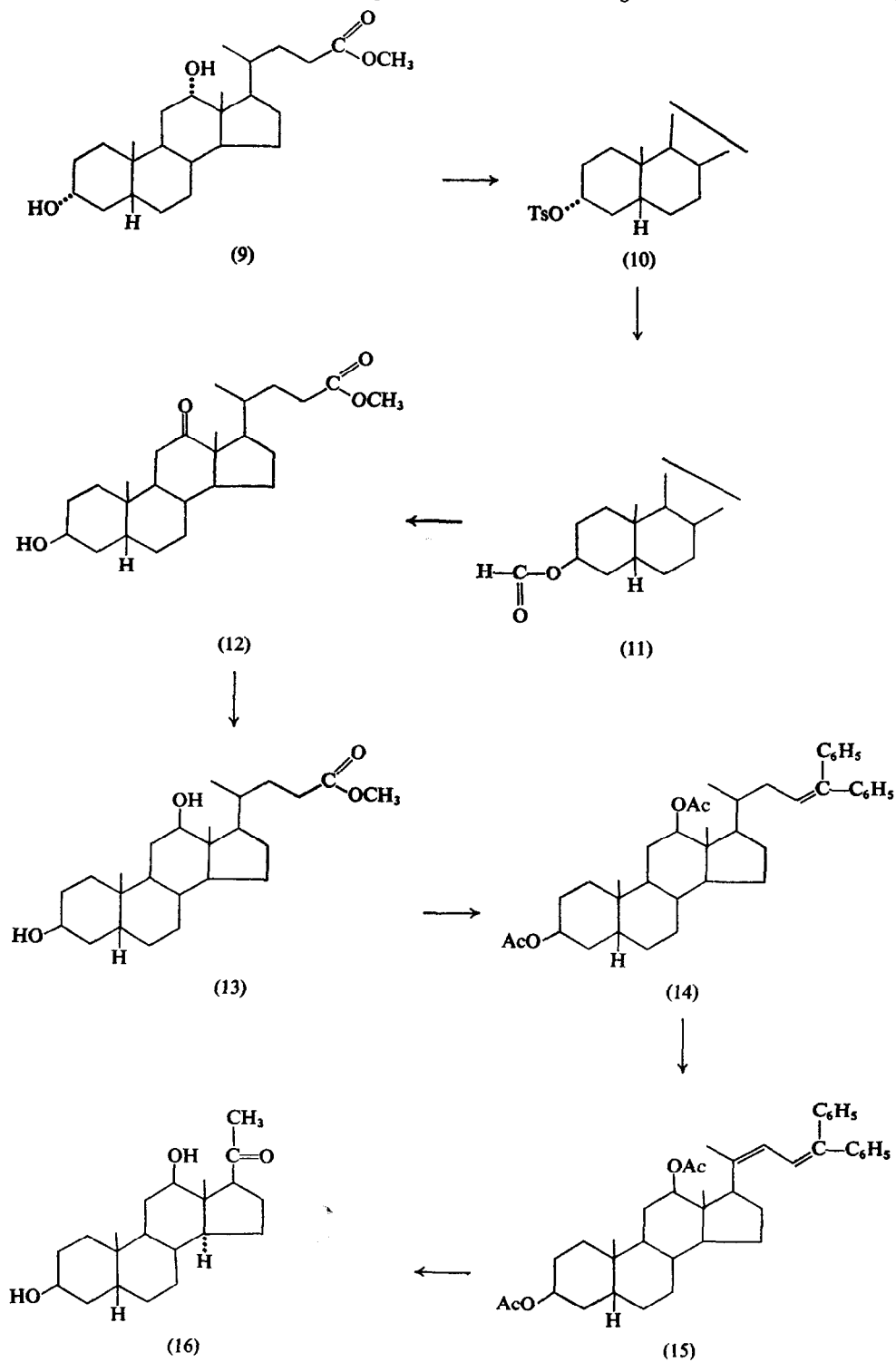


ABB. 3. SYNTHES DES 5β-H-PREGNANDIOL-3β,12β-ON-20.

Führte man die Reduktion des Ketons mit ^3H durch, so erhielt man eine in 12α -Stellung radioaktiv markierte Verbindung. Das in der OH-Gruppe gebundene ^3H liess sich durch Austausch in Methanol entfernen. (Die Hydrierung erfolgte im Radiochemical Centre Amersham.)

Methyl- $3\beta,12\beta$ -dihydroxycholanat (13) wurde dem Meystre-Miescher-Abbau¹⁷ unterworfen. Gleichzeitig wurde auch das $3\alpha,12\alpha$ -Epimere nach der gleichen Methode abgebaut, um Vergleichsmöglichkeiten zu schaffen. Verbindung (13) wurde mit Phenylmagnesiumbromid umgesetzt und das dabei entstandene tertiäre Carbinol in Eisessig dehydratisiert und gleichzeitig zum Δ^{23} - $3\beta,12$ -Diacetoxy-24,24-diphenylcholen (14) acetyliert.¹⁹ Der Vergleich der I.R.- und NMR-Spektren zeigte, dass es sich um das $3\beta,12\beta$ -OH Epimere handeln musste. ($3\beta,12\beta$: 3075, 1720, 1595, 1365 cm^{-1} , (9,34, 9,07, 8,0, 5,42, 4,95, 3,95, 2,83 μ): $3\alpha,12\alpha$: 3075, 1720, 1595, 1365 cm^{-1} (9,38, 9,1, 8,0, 3,95, 2,83 μ)).

TABELLE 3. VERGLEICH DER PHYSIKALISCHEN DATEN DER EPIMEREN PREGNANDIOLONE

	5β-H-Pregnandiol-3α,12α-on-20	5β-H-Pregnandiol-3β,12β-on-20		
Fp.	164°	113°		
Cotton-Effekt		positiv		
I.R.	3620, 1690	3620, 3440, 1680		
NMR	9,380 (C-18) 9,09 (C-19) 7,88 (C-21) 6,08 (3β-H 5 cps)	9,320 (C-18) 9,040 (C-19) 7,82 (C-21) 6,7 (12-H 5 cps) 5,93 (3α-H 2, 5 cps)		
Berechnung der NMR-Signale von C-18 und C-19				
	C-19	C-18	C-19	C-18
Grundwert	0,925	0,692	0,925	0,692
3-OH	0,008	0,008	0,050	0,008
12-OH	-0,008	0,042	0,008	0,067
17-H	-0,008	-0,083	-0,008	-0,083
	0,917	0,659	0,975	0,684
Gemessene Werte	0,910	0,620	0,960	0,680

Das Δ^{23} -Cholen wurde in Allylstellung mit *N*-Bromsuccinimid bromiert und zunächst durch Kochen in Dimethylanilin HBr eliminiert. Diese Eliminierung liess sich jedoch durch einfaches Stehenlassen in Aceton unter Zusatz von KJ sehr viel einfacher durchführen. Die Substanz wurde nicht kristallin erhalten und daher ohne weitere Reinigung sofort weiter verarbeitet. Das Dien (15) wurde mit Kaliumbichromat in Eisessig oxydiert, es entstand das $3\beta,12\beta$ -Diacetoxy-pregnanon-20, das durch Kochen unter N_2 mit 5% KOH in tert. Butanol verseift wurde.

Der positive Cotton-Effekt ist nur mit der 17β -Stellung der Seitenkette vereinbar. Die starke Wasserstoffbrückenbindung im I.R. bei 3440 cm^{-1} beweist weiter die 12β -Konfiguration der OH-Gruppe. Das 12α -Epimere zeigt diese Wasserstoffbrücke nicht. Die Lage der Resonanzsignale von C-18 und C-19 im NMR stimmt mit den berechneten Werten gut überein.

¹⁸ B. RIEGEL, R. D. HOFFETT und A. V. MCINTOSH, *Org. Syn.* **24**, 41, John Wiley, New York (1944).

¹⁹ T. REICHSTEIN und E. V. ARX, *Helv. Chim. Acta* **23**, 747 (1940).

Zum weiteren Strukturbeweis wurde 5 β -H-Pregnandiol-3 β ,12 β -on-20 (16) und das 3 α ,12 α -Epimere nach Jones zum 5 β H-Pregnantrion-3,12,20¹⁸ oxydiert. Die Oxydationsprodukte erwiesen sich als identisch.

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeines

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Mikroskopheiztisch nach Weygand bestimmt. Die optische Drehung wurde mit dem Perkin-Elmer Polarimeter 141 in CHCl₃ ermittelt. Die I.R.-Spektren und NMR-Spektren wurden mit dem Varian A 60 NMR-Spektrometer ausgeführt. Die U.V.-Spektren wurden mit dem Cary 14 Spektrophotometer der Applied Physics Corp. in MeOH bestimmt. Für die analytische Dünnschichtchromatographie (D.CH.) wurde Kieselgel G der Fa. Merck benutzt. Die Substanzflecken wurden durch Besprühen mit Chromschwefelsäure sichtbar gemacht. Beim Erwärmen auf 135° wurden die Substanzen in charakteristischer Weise angefärbt. Zur präparativen D.CH. wurden Glasplatten (20 × 20) mit einem Brei von 20 g Kieselgel HF₂₄₅ (Merck) und 65 ml Wasser gleichmässig beschichtet und nach Lufttrocknung eine halbe Stunde bei 105° C aktiviert.

Für Radiochromatogramme benutzte man den Scanner LB 2720 (Fa. Berthold) bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 120 mm/h. Als Messdetektor diente der Methandurchflusszähler FH 525 (Schlitzweite: 2 mm), der eine Zählausbeute von etwa 0,1% der aufgetragenen Aktivität bei Dünnschichtplatten ermöglicht. Die spezifischen Aktivitäten wurden mit dem fensterlosen Methandurchflusszähler FH₄₀₇ und Handprobwechsler BL₅₀₃ (Fa. Friesseke u. Höpfner) gemessen.

Legaltest. 1 mg Substanz wurde in ca. 1 ml Alkohol gelöst und mit einem Tropfen einer 0,5%-igen Lösung von Natriumnitroprussiat in Wasser versetzt. Die nach Zugabe von einem Tropfen 10%-igen KOH auftretende Rotfärbung erwies die Anwesenheit eines Cardenolids.

22-¹⁴C-Digitoxigenin. 217 mg (0,5 mM) 3 β ,21-Diacetoxy-14 β -hydroxy-5 β H-pregnan-on-20 wurden in der Trockenpistole sehr sorgfältig getrocknet und in 2 ml absolutem, thiophenfreiem Benzol gelöst. Der Lösung wurden 220 mg abgefräste Zn-Späne zugefügt. Die Späne waren vorher im Trockenschrank getrocknet und mit einigen Körnchen HgCl₂ präpariert worden. Zu dieser Mischung gab man 157 mg = (1 mM) 2-¹⁴C-Bromessigsäuremethylester (spez. Aktivität 1 mc/mM). Das Gemisch wurde in einem kleinen Kolben unter N₂-Atmosphäre und Rühren auf 80° erwärmt, wobei die Reaktion unter Abscheidung einer weissen Gallerte in Gang kam. Nach 1½ Stdn. wurden einige Tropfen wasserfr. ÄtOH zugesetzt und nach weiterem halbstündigen Erhitzen vom Zn abdekantiert. Die alkoholische Phase wurde eingedampft, der Rückstand in Ät₂O aufgenommen und die Lösung mit 2N HCl geschüttelt. Nach Neutralwaschen, Trocknen und Eindampfen der ätherischen Phase wurde die Substanz in 2 ml Pyridin und 2 ml Acetanhydrid 24 Stdn. bei 36° nachacetyliert. Nach Entfernen des Lösungsmittels liess sich das Reaktionsgemisch mit Hilfe der präparativen D.CH. durch dreimaliges Entwickeln im System Benzol/Essigester 4:1 auftrennen.

Die Digitoxigeninacetat-fraktion gelöst in 7,5 ml Alkohol wurde nach Zugabe von 0,44 ml konz. HCl in 0,6 ml Wasser 5 Tage bei Zimmertemperatur verseift. Nachdem mit Na₂CO₃ neutralisiert worden war, wurde der ÄtOH abgedampft. Die wässrige Phase extrahierte man mit CHCl₃. Der nach Abdampfen des Lösungsmittels verbliebene Rückstand wurde auf der präparativen D.CH. durch dreimaliges Entwickeln in Benzol/Essigester 2:1 aufgetrennt. Es wurden drei Substanzen und zwar 4¹⁴-Anhydrodigitoxigenin, Digitoxigenin und unverändertem Acetat isoliert. Die folgenden Werte wurden mit einer nach dem gleichen Verfahren hergestellten nicht radioaktiven Probe bestimmt: Ausbeute 74%, Schmp. 250°, die Verbindung zeigte keine Depression nach Vermischen mit authentischem Material. U.V.: λ_{max} = 218 nm, I.R.: Banden völlig identisch mit denen von authentischem Material (α)_D¹⁵ = +18,5° (CHCl₃), Legaltest positiv.

Synthese von 5 β -H-Pregnandiol-3 β ,12 β -on-20 und 5 β H-Pregnandiol-3 α ,12 α -on-20

Methyl-desoxycholanat (9). 20 g Desoxycholsäure wurden in 100 ml ÄtOH gelöst und unter starkem Rühren langsam mit einer ätherischen Lösung von CH₂N₂ bis zur leichten Gelbfärbung versetzt. Nach Abdampfen der organischen Phase erhielt man 20,8 g Methyl-desoxycholanat vom Schmp. 98°.

Methyl-desoxycholanat-3 α -tosylat (10). 20 g (I) wurden in 30 ml absolutem Pyridin gelöst und bei 0° innerhalb von 5 Min 13 g *p*-Toluolsulfochlorid in 20 ml absolutem Pyridin hinzugefügt. Die Lösung blieb 1 Std. bei 0° und 20 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen. Sodann wurde mit 5 g Eis versetzt. Nach einer weiteren 1/2 Std. wurden etwa 100 ml Eiswasser zugesetzt und dann mit Ät₂O extrahiert. Nach Befreien der Ätherlösung von Pyridin durch Schütteln mit verdünnter HCl wurde bis zur Abscheidung der ersten Kristalle eingedampft. Die Kristallisation wurde durch Abkühlen auf 0° vervollständigt. Ausbeute 21 g, Schmp. 148°.

(Methyl-3 β ,12 α -dihydroxycholanat)3 β -formiat (11). 20 g (10) wurden nach Lösen in 1,2 l ungereinigtem *N,N*-Dimethyl-formamid auf einer konstanten Temperatur von 77–78° gehalten. Der Verlauf der Reaktion liess sich chromatographisch verfolgen. Nach etwa 80 Stdn. war das Ausgangsprodukt vollkommen umgesetzt. Durch Versetzen mit H₂O bis zur schwachen Trübung und Abkühlen liessen sich 12,7 g eines kristallinen farblosen Materials gewinnen. 500 mg davon wurden an 50 g Kieselgel mit Petroläther/Ät₂O 5:1 aufgetrennt.

Das Hauptprodukt ergab bei der Kristallisation farblose Prismen vom Schmp. 161°. Die restlichen 12,2 g wurden nicht weiter gereinigt und sofort in der nächsten Stufe eingesetzt.

Methyl-3 β -hydroxy-12-ketocholanat (12). 10 g (11) wurden in 200 ml Eisessig gelöst und zur Lösung langsam 8 g K₂CrO₄ in 15 ml H₂O hinzuge tropft. Die Lösung wurde über Nacht gerührt, dann wurde H₂O hinzugefügt bis Kristallisation eintrat. Die Kristalle wurden nach gründlichen Waschen mit H₂O an der Luft getrocknet. Das trockene Produkt löste man in 60 ml heissem MeOH und fügte nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur 0,25 ml konz. HCl hinzu. Nach einstündigem Rühren wurden 150 ml H₂O hinzugegeben und der ausgefallene Niederschlag abgesaugt. Nach Waschen und Trocknen wurde aus Benzol/Petroläther umkristallisiert. 6,4 g Nadeln, Schmp. 172°.

Methyl-3 β ,12 β -dihydroxycholanat (13). 3 g (12) wurde in 75 ml MeOH gelöst und bei 3 Atm. in einem Autoklaven in Gegenwart von 5 g Raney-Nickel (Degussa) hydriert. Chromatographisch war nach 4 Stdn. kein Ausgangsprodukt mehr festzustellen. Es hatte sich das 12 β - und das 12 α -Derivat im Verhältnis von etwa 9:1 gebildet. Das Gemisch wurde auf einer Säule an 600 g Kieselgel mit CHCl₃ und steigendem Anteil Aceton (von 1 bis 5%) getrennt. Ausbeute: 2,54 g farblose ölige Substanz (Physikalische Daten: siehe Seite 1510).

Δ^{23} -3 β ,12 β -Diacetoxy-24,24-diphenylcholen (14). Aus 2 g Mg und 15 g Brombenzol in 25 ml trockenem Ät₂O wurde eine Lösung von Phenylmagnesiumbromid hergestellt. Zu der Grignard-Lösung wurden 2 g (12) in 15 ml trockenem Benzol gegeben. Nach dreistündigem Kochen versetzte man die abgekühlte Lösung mit 15 g Eis und 15 ml konz. HCl. Nach dem Abtrennen der organischen Schicht wurde mit Ät₂O nachextrahiert. Die neutral gewaschene organische Phase wurde zur Entfernung des Biphenyls einer Wasserdampfdistillation unterworfen. Das Rohprodukt wurde mit Ät₂O extrahiert und der Eindampfrückstand getrocknet.

Die Dehydratisierung und Acetylierung liess sich durch einstündiges Kochen in 10 ml Eisessig und 5 ml Acetanhydrid durchführen. Nach Abtrennen des Eisessigs durch Destillation wurde der Rückstand mit H₂O aufgeschlemmt und das Reaktionsprodukt mit Ät₂O extrahiert. Der Extrakt wurde an 200 g Kieselgel mit Benzol/Aceton 100:1 chromatographiert. Ausbeute: 2,04 g farbloses Öl. NMR: 9,33 (C-18), 9,06 (C-19), 8,00 (3,12 Acetyl), 5,4 (12 α -H, Jea 5,6 cps), 4,95 (3 α H-Jea 2,5 cps), 4,0 (C-23).

Δ^{23} -3 α ,12 α -Diacetoxy-24,24-diphenylcholen wurde analog (14) aus Methyl-desoxycholanat hergestellt. Kristalle vom Schmp.: 159–160,5°.

$\Delta^{20,23}$ -3 β ,12 β -Diacetoxy-24,24-diphenylcholadien (15). 2 g (14) und 600 mg *N*-Bromsuccinimid übergoss man in einem kleinen Kolben mit 20 ml CCl₄. Die Lösung wurde mit einer 500 Watt Glühbirne bestrahlt und erhitzt. Nach 15 Min hatte sich das freigesetzte Succinimid oben abgeschieden. Die Lösung wurde abgekühlt und eingedampft. Der Rückstand wurde in 20 ml Aceton gelöst und nach Zugabe von 1 g Kaliumjodid 48 Stdn. stehengelassen. Dann wurde filtriert, das gebildete Jod mit einigen Tropfen Na₂S₂O₃-Lösung reduziert und die Lösung eingengt. Der Rückstand wurde an 200 g Kieselgel mit Benzol/Aceton 100:1 chromatographiert. Es wurde ein farbloses Öl erhalten, welches chromatographisch von (14) nicht zu unterscheiden war. Ausbeute: 925 mg.

Das nach dem gleichen Verfahren hergestellte.

$\Delta^{20,23}$ -3 α ,12 α -Diacetoxy-24,24-diphenylcholadien (15) liess sich aus Aceton umkristallisieren und hatte einen Schmp. von 144°.

5 β H-Pregnandiol-3 β ,12 β -on-20 (16). 900 mg (15) wurden in 3 ml Eisessig gelöst. Unter Kühlen gab man hierzu 0,6 g CrO₃ in 3 ml Eisessig, hielt 1 Std. bei 0° und weitere 15 Stdn. bei 20°. Das überschüssige Bichromat wurde durch Zugabe von 1,5 ml MeOH reduziert. Nun wurde mit Ät₂O extrahiert. Nach Abdampfen der organischen Phase wurde der ölige Rückstand in 5 ml MeOH gelöst, mit 300 mg zerkleinertem KOH versetzt und die Mischung 1 Std. am Rückfluss gekocht. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde mittels präparative D.CH. getrennt (Chloroform/Aceton 6:1). Ausbeute: 40 mg (Physikalische Eigenschaften vergl. Seite 1512). Analog liess sich.

5 β H-Pregnandiol-3 α ,12 α -on-20 herstellen. (Physikalische Eigenschaften vergl. Seite 1512).

5 β H-Pregnantrion-3,12,20. 9 mg (16) wurden in 5 ml Aceton gelöst und innerhalb von 5 Min 4 Tropfen Jones Reagenz zugegeben. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde ein Öl erhalten, welches auf einer kleinen Dünnschichtplatte (1 g Kieselgel) im System CHCl₃/Aceton 20:1 getrennt wurde. Ausbeute: 6 mg farblose Kristalle, Schmp.: 199°. Analog wurde die 3 α ,12 α -Verbindung oxydiert. Schmp.: 199,5°. Der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression. Er lag bei 199°.

12 α -³H-Pregnandiol-3 β ,12 β -on-20. Als radioaktives Ausgangsprodukt bot sich das 12 α -³H-Methyl-3 β ,12 β -dihydroxycholanat an, das durch katalytische Hydrierung von (12) im Radiochemical Centre Amersham erhalten wurde. Das nach dem Meystre-Miescher-Abbau erhaltene Material besass einespez. Aktivität von 1,92·10⁷ Imp/min mg. Die Ausbeute von 1 g (12) betrug 4 mg radiochromatographisch einheitliches Produkt.

PFLANZENVERSUCHE

Applikation über die Blattoberfläche

Alle Pflanzenversuche wurden in gleicher Weise durchgeführt. Je Versuch wurden zwei bis drei kräftige Pflanzen von *Digitalis lanata* Ehrh. ausgewählt. Die vier kräftigsten Blätter jeder Pflanze wurden mit einer

Lösung von 2% Tween 20 in H₂O gewaschen. Je Pflanze wurde der entsprechende Precursor in 0,3 ml ÄtOH appliziert. Die Applikation geschah mit Hilfe einer kleinen Pipette auf die Blattspreite. Nach dem Eintrocknen der alkoholischen Lösung wurden die applizierten Blätter mit einer Mischung von Petroläther/Siliconöl 1:1 besprüht. Das nach Verdampfen des Petroläthers hinterbliebene Siliconöl wurde rasch resorbiert und war innerhalb von 6 Std. von der Blattoberfläche verschwunden.

Isolierung der Cardenolide

Die Blätter von *D. lanata* wurden kurz über der Wurzel abgeschnitten. Ihr Gewicht betrug etwa 20 g. Nach dem Abwaschen des nicht aufgenommenen Precursors wurden die Blätter mit dem Ultraturax breiartig zerkleinert und zweimal mit je 500 ml MeOH 24 Std. unter Rühren extrahiert. Es wurde von den Pflanzenresten abgesaugt und der dunkelgrüne Extrakt im Vakuum zur Trockne eingedampft. Danach gab man 50 ml H₂O und 25 ml Cyclohexan hinzu und rührte solange bei 40°, bis alles in Lösung gegangen war. Die wässrige, gelbgrüne Unterphase enthielt die Cardenolid-glykoside. Die Cyclohexanphase war durch unpolare Bestandteile des Chlorophylls intensiv grün gefärbt. Durch mehrmaliges Ausschütteln mit Cyclohexan wurde die wässrige Phase nahezu vollständig von den grünfärbenden Bestandteilen befreit. Die Cardenolid-glykoside konnten durch Extraktion mit CHCl₃/Methanol 9:1 der wässrigen Phase entzogen werden.

Zur Glykosidspaltung wurde der Extrakt eingedampft und mit 25 ml MeOH und 25 ml 0.1 n H₂SO₄ 20 Min. am Rückfluss gekocht. Nach Neutralisation (NaHCO₃ Lösung) und Abdampfen des MeOH konnten die Aglykone Digitoxigenin, Digoxigenin und Gitoxigenin durch Extraktion mit CHCl₃ gewonnen werden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte durch präparative D.C.H. mit CHCl₃/Methanol 9:1. Die isolierten Cardenolide wurden jeweils mit 10 mg inaktivem Material verdünnt und erneut chromatographiert. Nach der Zugabe von weiterem inaktivem Material wurde bis zur konstanten spezifischen Aktivität kristallisiert.

Die Pregnanderivate wurden entsprechend mit Hilfe der präparativen D.C.H. aus der Cyclohexanphase isoliert.

Annerkungen—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft vielmals für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.