

Zur Biosynthese von Steroidderivaten im Pflanzenreich, XXIV¹⁾

Synthese von 3 β -Hydroxy-5 β -pregn-8(14)-en-20-on und 3 β -Acetoxy-8,14-epoxy-5 β -pregnan-20-on zur Aufklärung der 14 β -Hydroxylierung bei der Cardenolid-Biosynthese

Rudolf Tschesche* und Wolfgang Führer

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,
Gerhard-Domagk-Str. 1, D-5300 Bonn 1

Eingegangen am 23. Oktober 1978

4,7-Pregnadien-3,20-dion (4) wurde selektiv zum Gemisch von 5 α /5 β -Pregn-7-en-3,20-dion (5 α -5/5 β -5) hydriert. Nach chromatographischer Isomerentrennung wurde 5 β -5 an einem Pd/Pt-Katalysator zu 3 β -Hydroxy-5 β -pregn-8(14)-en-20-on (6) umgesetzt. Acetylierung zu 6a und anschließende Reaktion mit 4-Nitroperbenzoesäure ergab das α / β -Isomerengemisch des 3 β -Acetoxy-8,14-epoxy-5 β -pregnan-20-ons (7).

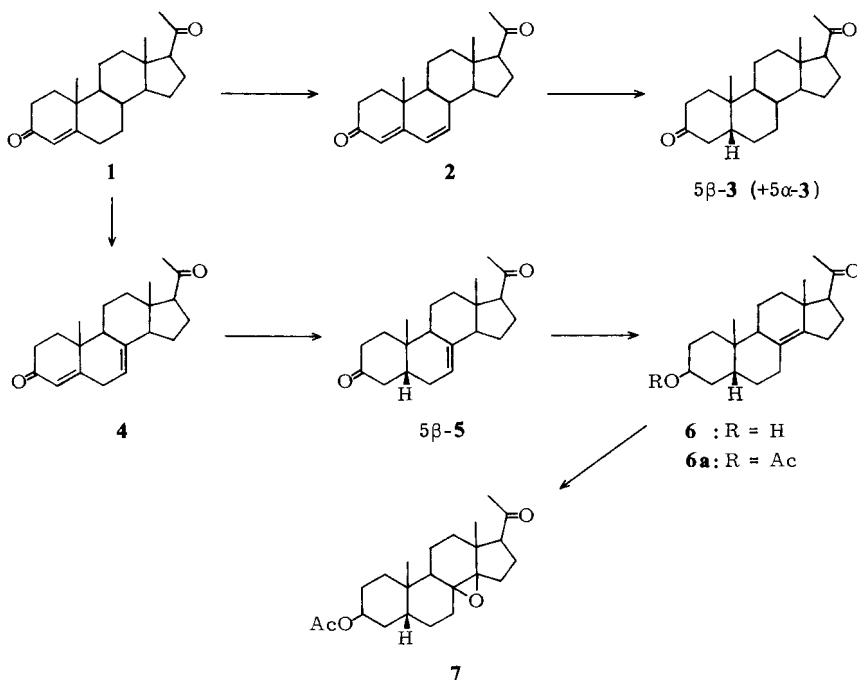
Biosynthesis of Steroid Derivatives in the Plant Kingdom, XXIV¹⁾

Synthesis of 3 β -Hydroxy-5 β -pregn-8(14)-en-20-one and 3 β -Acetoxy-8,14-epoxy-5 β -pregnan-20-one to Clear the 14 β -Hydroxylation in the Biosynthesis of Cardenolide Derivatives

4,7-Pregnadiene-3,20-dione (4) was hydrogenated selectively to a mixture of 5 α /5 β -pregn-7-ene-3,20-dione (5 α -5/5 β -5). After chromatographic separation of the isomers, 5 β -5 was converted by a Pd/Pt-catalyst to 3 β -hydroxy-5 β -pregn-8(14)-en-20-one (6). Acetylation to 6a, followed by the reaction with 4-nitroperbenzoic acid, gave a mixture of α / β -isomers of 3 β -acetoxy-8,14-epoxy-5 β -pregnan-20-one (7).

Die Biosynthese der Cardenolide aus Cholesterin über die Zwischenstufen Progesteron bzw. Pregnenolon und 3 β ,14 β -Dihydroxy-5 β -pregnan-20-on kann in den Grundzügen als gesichert angesehen werden. Die Einführung der C-Atome 22 und 23 geschieht erst auf der letzten Stufe²⁾. Strittig ist dagegen immer noch der Weg der 14 β -Hydroxylierung, die wohl am Pregnangerüst erfolgt³⁾. Das Konzept einer intermediären Einführung einer 8(14)-Doppelbindung⁴⁾ mit daraus resultierendem Epoxid und dessen anschließender Öffnung, das auch durch die Konstitutionen des in *Nerium oleander* L. aufgefundenen Adynerins⁵⁾ sowie des 8(14)-Secocardenolids Neriasid⁶⁾ gestützt wird, steht im Widerspruch zu der Beobachtung, daß 8-tritiummarkiertes Cholesterin ohne eindeutigen Aktivitätsverlust in Digitoxin eingebaut werden soll⁷⁾. Dabei fehlen allerdings eindeutige Abbauprobversuche, so daß über den Verbleib der Markierung auf dem Weg vom Cholesterin zum Digitoxin keine klare Aussage gemacht werden kann.

Diese Unstimmigkeit gab Anlaß, frühere Ergebnisse⁴⁾ zu überprüfen. Dabei zeigte sich⁸⁾, daß der Weg zum 5 β -Pregn-8(14)-en-3,20-dion aus Progesteron unter den angegebenen Bedingungen⁴⁾ nicht reproduziert werden konnte⁹⁾. Allerdings ließ sich der damals vorgeschlagene Reaktionsweg mit gewissen Modifikationen übernehmen.



4,7-Pregnadien-3,20-dion (4) ist aus Progesteron (1) in drei Stufen erhältlich¹⁰⁾. Dabei mußte auf sorgfältige Kristallisation auch der Zwischenprodukte geachtet werden, da sonst das (chromatographisch gleichlaufende!) Progesteron bzw. dessen Folgeprodukte im weiteren Reaktionsverlauf ständig mitgeschleppt wurden. 4 ließ sich in Ethanol mit Palladium auf Kohle (10%) und Calciumcarbonat selektiv an der carbonyl-konjugierten Doppelbindung zu einem Gemisch von 5 α /5 β -Pregn-7-en-3,20-dion (5) (etwa 1:1) hydrieren. Unter diesen Bedingungen war Enolisierung, die zur Bildung einer durchgehenden Konjugation von C-3 bis C-8 und dann zur völligen Hydrierung führen würde⁸⁾, nicht möglich.

Die präparative Trennung der A,B-*cis*- und -*trans*-Derivate 5 β -5 und 5 α -5 konnte schichtchromatographisch auf Kieselgel bei 40 cm Laufstrecke und mehrmaliger Entwicklung erreicht werden. Die Zuordnung der beiden erhaltenen Produkte zur 5 β - und 5 α -Reihe erfolgte aufgrund der ¹³C-Verschiebungswerte (analog z. B. Smilagenin-Tigogenin¹¹⁾) und ergab bei 5 β -Konfiguration infolge zusätzlicher Abschirmung der C-Atome in den Ringen A und B geringere Verschiebungen, während C-19 beträchtlich entschirmt wird. 5 β -5 erwies sich als die polarere Fraktion.

Die Isomerisierung von 5 β -5 zu 6 mit 8(14)-Doppelbindung gelang mit Pd/C auch nach über 20 Stunden nur partiell, während mit PtO₂/Eisessig schon nach wenigen Stunden beide Carbonylgruppen reduziert waren. Als besonders günstig erwies sich ein Mischkatalysator aus Palladium (10% auf Kohle) mit ca. 0.5% Platinschwamm bei 20 Stunden Reaktionsdauer und Raumtemperatur in Eisessig. Hierbei wurde die Doppelbindung

vollständig nach 8(14) verschoben; die zugleich erfolgte Reduktion zum 3 β -Alkohol war für die beabsichtigte Markierung und den Pflanzenversuch ohne Belang.

Nach Acetylierung zu **6a** wurde mit 4-Nitroperbenzoesäure¹²⁾ in Chloroform zum 8,14-Epoxid **7** umgesetzt. Erwartungsgemäß fiel das gewünschte β -Epoxid nur zum

Tab. 1. Geschätzte und gemessene ^1H -Methylresonanzen von CH_3 -18 und -19 ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}_{\text{int.}}$, δ -Werte)

Verb.	CH_3 -18		CH_3 -19	
	geschätzt	gemessen	geschätzt	gemessen
1	0.68	0.69	1.20	1.21
2	0.73	0.72	1.18	1.13
3	0.65	0.64	1.03	1.03
4	0.57	0.56	1.19	1.19
5 α - 5	0.53	0.53	1.02	1.01
5 β - 5	0.53	0.53	1.03	1.02
6	0.79	0.79	0.85	0.83
6a	0.79	0.81	0.86	0.85
7 (α)	0.92		1.05	
7 (β)	0.88	0.90	1.05	1.05

Tab. 2. ^{13}C -NMR-Verschiebungen ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}_{\text{int.}}$, δ -Werte, 20 MHz)

C-Atom	1	2	4	5 α - 5	5 β - 5	6	6a	7
1	35.8	33.9	34.1	38.6	35.5	29.4	30.3	29.8
2	32.8	33.9	32.8	38.1	38.9	28.3	25.5	25.8
3	199.1	199.1	199.1	211.7	212.4	67.0	70.6	70.3
4	123.9	123.9	123.1	44.2	43.5	33.6	30.5	30.4
5	170.8	163.6	168.4	42.9	37.7	36.7	37.4	37.1
6	31.9	128.3	33.3	30.1	28.3	26.8	26.6	25.8
7	33.9	140.7	117.0	118.5	116.1	35.8	35.8	31.1
8	35.6	37.6	138.7	138.6	137.2	139.5	139.7	80.5 (69.7)
9	53.7	50.6	45.7	48.7	41.8	36.7	36.7	32.5
10	38.6	36.1	38.2	34.5	33.8	36.8	36.7	37.1
11	21.1	20.7	21.9	21.7	22.2	19.7	19.7	19.0
12	24.4	23.9	23.1	23.3	23.0	24.8	25.0	24.6
13	43.9	44.7	44.7	44.7	45.2	43.6	43.8	43.9 (46.5)
14	56.1	53.7	54.9	55.1	55.3	128.7	128.1	66.4 (64.1)
15	22.9	22.9	22.7	22.6	22.8	23.5	23.5	21.3
16	38.7	38.6	38.3	38.9	37.7	25.6	25.5	25.4
17	63.5	63.3	63.2	63.5	63.4	64.5	64.3	61.0
18	13.3	13.2	13.2	13.2	13.2	19.7	19.7	15.8 (16.4)
19	17.3	16.3	21.2	12.4	23.4	24.8	24.5	26.3
20	209.2	209.0	209.1	209.4	209.3	210.1	209.8	209.3
21	31.3	31.5	31.4	31.5	31.4	31.5	31.5	31.6
Acetat							170.5	170.4
							21.4	21.5

Bei **7** ist das α -Epoxid angegeben; die Werte für das β -Epoxid sind, soweit deutlich abgesetzt, in Klammern beigelegt.

kleineren Teil an [analog zum 8,14-Anhydrodigitoxigenin⁵⁾]. Die Intensitäten der ¹³C-Signale lassen auf ein ungefähres Verhältnis 1:2 schließen. Chromatographisch ergaben sich keine Unterscheidungsmerkmale, auch eine präparative Isomerentrennung gelang bisher nicht. Durch Kristallisation aus Methanol konnte lediglich das α -Isomere bzw. in der Mutterlauge das β -Isomere angereichert werden. Diese Probleme überraschten nicht nach den Erfahrungen mit den analogen Cardenolid-Derivaten⁵⁾, andererseits ist aber zur Beantwortung der Frage, ob überhaupt ein 8,14-Epoxid bei der Biosynthese der Cardenolide eine Rolle spielt^{4,7)}, eine exakte Isomerentrennung nicht unbedingt erforderlich.

Da im Verlauf des Syntheseweges ohnehin hydriert wurde, können die Endverbindungen 6 und 7 ohne weiteres mit Tritium markiert werden. Über die Ergebnisse der Pflanzenversuche mit 6 und 7 wird an anderer Stelle berichtet werden¹³⁾.

Die Ergebnisse von Massenspektrometrie und Protonenresonanz stützten die Synthesannahmen vollständig. Abschätzung der ¹H-Methylresonanzen von CH₃-18 und -19¹⁴⁾ ergab sehr gute Übereinstimmung mit den gemessenen Werten (Tab. 1).

Bei der Zuordnung der ¹³C-Verschiebungswerte stellte sich heraus, daß die (schon relativ zurückliegende) Literatur bezüglich Progesteron und einer Reihe seiner Derivate¹⁵⁾ offensichtlich Irrtümer enthält. Die nachstehend vorgenommene Festlegung, die dann auch auf die analogen Verbindungen¹⁵⁾ auszudehnen wäre, steht mit den Befunden gekoppelter Spektren ("off resonance") weniger im Widerspruch (Tab. 2).

Eine weitere Hilfe war der Vergleich mit Digitoxigenin¹⁶⁾.

Wir danken Herrn Dr. B. Streuff für seine Mithilfe bei den Kernresonanzuntersuchungen sowie der Fa. Hoechst AG, Frankfurt/M., für kostenlose Lieferungen von Verbrauchsmaterial.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Mikroskopheiztisch nach Kofler-Weygand. — Massenspektren: MS-30 (A.E.I.). — ¹H-NMR: Varian EM-360, TMS intern. — ¹³C-NMR: Bruker WP-80. — Opt. Drehwerte: Perkin-Elmer Polarimeter 241. — Dünnschichtchromatographie: Glasplatten 5 × 10 cm, 0.25 mm Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck); zusätzlich wurde mit 40proz. Schwefelsäure angesprüht (140°C). — Präparative Schichtchromatographie: Selbstgestrichene Platten mit Kieselgel 60 PF₂₅₄ bzw. 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ (Merck), ca. 5 g/dm²; eluiert wurde jeweils 2 h im Soxhlet-Extraktor mit Aceton. Laufmittelsysteme: A: Benzol/Essigester (5:1), B: Benzol/Essigester (12:1), C: Benzol/Essigester (4:1), D: Cyclohexan/Aceton (10:3).

Gemessene *R_F*-Werte:

System	1	2	4	5 α -3	5 β -3	5 α -5	5 β -5	6	6a	7
A	0.30	0.29	0.30	0.52	0.46	0.50	0.46	0.31	0.66	0.37
D	0.42	0.39	0.41	0.52	0.51	0.52	0.50	0.42	0.64	0.47

5 β -Pregn-7-en-3,20-dion (5 β -5): Eine Lösung von 0.80 g (2.56 mmol) 4,7-Pregnadien-3,20-dion (4)¹⁰⁾ in 80 ml Ethanol (96proz.) wurde mit 50 mg Pd/C (10%) und 1 Spatelspitze CaCO₃ versetzt und 1 h unter ca. 1 bar H₂ kräftig gerührt. Nachdem DC (System A) vollständigen Umsatz angezeigt hatte, wurde filtriert, i. Vak. zur Trockne eingeengt (0.72 g) und im System B auf 5 Platten 40 × 20 cm unter zweimaliger Entwicklung chromatographiert. Nach Auskratzen der

unteren Produktzone resultierten 230 mg (29%) 5 β -5, aus dem darüberliegenden Übergangsbereich konnten 160 mg 5 α /5 β -Gemisch (20%) wiedergewonnen werden. Schmp. 157–158°C (Dichlormethan/Petrolether 60–90°C), $[\alpha]_D^{20} = +127.9^\circ$ ($c = 0.68$, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.53$ (s, CH₃-18), 1.02 (s, CH₃-19), 2.15 (s, CH₃-21), 5.2 (m, 7-H). – ¹³C-NMR s. Tab. 2. – MS (70 eV): $m/e = 314$ (M⁺, 100%), 299 (M⁺ – CH₃, 10), 281 (M⁺ – CH₃, – H₂O, 90).

C₂₁H₃₀O₂ (314.5) Ber. C 80.21 H 9.62 5 β Gef. C 80.18 H 9.96

5 α Gef. C 80.85 H 9.62

5 α -Pregn-7-en-3,20-dion (5 α -5): Elution der oberen Produktzone vorstehender Chromatographie erbrachte 220 mg (27%) 5 α -5 mit Schmp. 185°C (Dichlormethan/Petrolether 60–90°C). $[\alpha]_D^{20} = +78.9^\circ$ ($c = 2.1$, CHCl₃). – ¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.53$ (s, CH₃-18), 1.01 (s, CH₃-19), 2.15 (s, CH₃-21), 5.2 (m, 7-H). – ¹³C-NMR s. Tab. 2. – MS (70 eV): $m/e = 314$ (M⁺, 100%), 299 (M⁺ – CH₃, 70), 281 (M⁺ – CH₃, – H₂O, 30), 271 (M⁺ – CH₃CO, 80), 229 (Ringe A – C, 40).

3 β -Hydroxy-5 β -pregn-8(14)-en-20-on (6): 220 mg (0.70 mmol) 5 β -5 wurden in 2 ml Eisessig (p. a.) gelöst. Als Hydrierkatalysator wurden 50 mg Palladium auf Kohle (10proz.), die 0.5% gebrauchten Platinschwamm enthielten, zugegeben. Nach 20 h Rühren unter ca. 1 bar H₂ bei Raumtemp. wurden 50 ml Dichlormethan zugesetzt, dann wurde filtriert, mit Wasser und NaHCO₃-Lösung neutral gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und nach Einengen i. Vak. auf einer Platte 20 × 20 cm im System C chromatographiert. Elution ergab 185 mg (83.5%) 6 mit Schmp. 123°C (Dichlormethan/Petrolether 60–90°C). $[\alpha]_D^{20} = +137.0^\circ$ ($c = 0.23$, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.79$ (s, CH₃-18), 0.83 (s, CH₃-19), 2.16 (s, CH₃-21), 4.15 (m, 3-H). – ¹³C-NMR s. Tab. 2. – MS (70 eV): $m/e = 316$ (M⁺, 90%), 301 (M⁺ – CH₃, 50), 298 (M⁺ – H₂O, 20), 283 (M⁺ – CH₃, – H₂O, 35), 273 (M⁺ – CH₃CO, 15), 255 (M⁺ – H₂O, – CH₃CO, 40), 147 (100).

C₂₁H₃₂O₂ (316.5) Ber. C 79.70 H 10.19 Gef. C 79.85 H 10.85

3 β -Acetoxy-8,14-epoxy-5 β -pregnan-20-on (7): Die Lösung von 160 mg (0.5 mmol) 6 in 2 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid wurde 12 h bei Raumtemp. stehengelassen und dann mit 50 ml Wasser versetzt. Nach dreimaligem Ausschütteln mit Chloroform wurde die organische Phase erst kurz mit 0.1 N HCl und dann mit NaHCO₃-Lösung neutral gewaschen. Diese Lösung von 3 β -Acetoxy-5 β -pregn-8(14)-en-20-on (6a) [¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.81$ (s, CH₃-18), 0.85 (s, CH₃-19), 2.06 (s, Ac), 2.13 (s, CH₃-21), 5.12 (m, 3-H). – ¹³C-NMR s. Tab. 2. – MS (70 eV): $m/e = 358$ (M⁺, 30%), 343 (M⁺ – CH₃, 10), 315 (M⁺ – CH₃CO, 5), 300 (M⁺ – CH₃CO, – CH₃, 50), 298 (M⁺ – AcOH, 70), 283 (M⁺ – AcOH, – CH₃, 60), 255 (M⁺ – AcOH, – CH₃CO, 60), 240 (300 – AcOH, 10), 147 (100)] wurde nach Trocknen über MgSO₄ auf 5 ml eingengt und zusammen mit 160 mg 4-Nitroperbenzoesäure¹⁷⁾ gelöst in 40 ml Chloroform, 5 h bei Raumtemp. stehengelassen. Nach mehrfachem Auswaschen mit NaHCO₃-Lösung wurde über Na₂SO₄ getrocknet, eingengt und im System A auf einer Platte 20 × 20 cm chromatographiert. Elution ergab 95 mg (50%) 7, das aus Methanol in Nadeln mit Schmp. 109–115°C kristallisierte. $[\alpha]_D^{20} = +110.3^\circ$ ($c = 0.34$, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.90$ (s, CH₃-18), 1.05 (s, CH₃-19), 2.06 (s, Ac), 2.12 (s, CH₃-21), 5.1 (m, 3-H). – ¹³C-NMR s. Tab. 2. – MS (70 eV): $m/e = 374$ (M⁺, 15%), 359 (M⁺ – CH₃, 100), 314 (M⁺ – AcOH, 60), 299 (M⁺ – AcOH, – CH₃, 12).

C₂₃H₃₄O₄ (374.5) Ber. C 73.76 H 9.15 Gef. C 73.35 H 9.35

Literatur

- ¹⁾ XXIII. Mittel.: *R. Tschesche* und *M. Spindler*, *Phytochemistry* **17**, 251 (1978).
- ²⁾ *R. Tschesche*, *R. Becker* und *R. Hombach*, *Z. Naturforsch., Teil B* **23**, 1615 (1968).
- ³⁾ *R. Tschesche*, *H. Hulpke* und *H. Scholten*, *Z. Naturforsch., Teil B* **22**, 677 (1967).
- ⁴⁾ *R. Tschesche* und *U. Kleff*, *Phytochemistry* **12**, 2375 (1973).
- ⁵⁾ *P. St. Janiak*, *E. Weiss*, *J. v. Euw* und *T. Reichstein*, *Helv. Chim. Acta* **46**, 374 (1963).
- ⁶⁾ *T. Yamauchi* und *F. Abe*, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1825.
- ⁷⁾ *D. J. Aberhart*, *J. G. Lloyd-Jones* und *E. Caspi*, *Phytochemistry* **12**, 1065 (1973).
- ⁸⁾ *W. Menniken*, Diplomarbeit, Univ. Bonn 1975.
- ⁹⁾ Es resultierten 4,6-Pregnadien-3,20-dion (**2**) und im weiteren 5 α /5 β -Pregnan-3,20-dion (**3**). 5 α /5 β -3 läßt sich wie 5 α /5 β -**5** auftrennen.
- ¹⁰⁾ *R. Antonucci*, *S. Bernstein*, *R. Lennard*, *K. J. Sax* und *J. H. Williams*, *J. Org. Chem.* **17**, 1369 (1952).
- ¹¹⁾ *H. Eggert* und *C. Djerassi*, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 3635.
- ¹²⁾ *G. Ponsinet*, *G. Ourisson* und *G. Charles*, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 4453.
- ¹³⁾ *R. Tschesche*, *Phytochemistry*, in Vorbereitung.
- ¹⁴⁾ *R. F. Zürcher*, *Helv. Chim. Acta* **46**, 2054 (1963).
- ¹⁵⁾ *H. J. Reich*, *M. Jautelat*, *M. T. Messe*, *F. J. Weigert* und *J. D. Roberts*, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 7445 (1969).
- ¹⁶⁾ *K. Tori*, *H. Ishii*, *Z. W. Wolkowski*, *C. Chachaty*, *M. Sangaé*, *F. Piriou* und *G. Lukacs*, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 1077.
- ¹⁷⁾ *M. Vilkas*, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1959**, 1401.

[399/78]