

244. 14-Epi-Digitoxigenin und 3-Desoxydigitoxigenin

19. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]

von **W. Zürcher, E. Weiss-Berg** und **Ch. Tamm**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(14. X. 69)

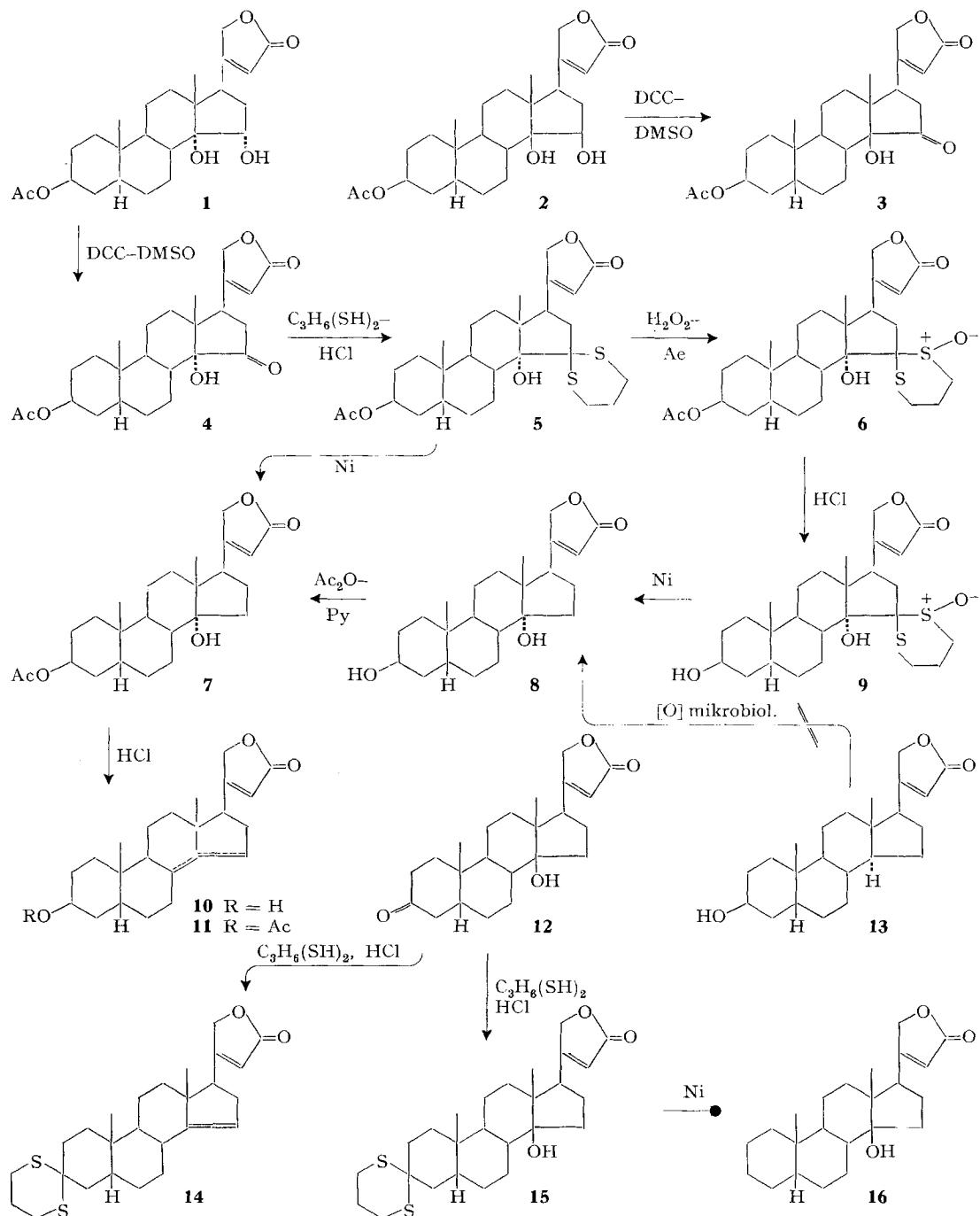
Summary. The synthesis of the hitherto unknown 14-*epi*-digitoxigenin (**8**) and of 3-deoxy-digitoxigenin (**16**) is described. The 15,15-propylene-thio-sulfoxides **6** and **7** proved to be valuable intermediates. The results of the cardiotonic activity (ATPase test) of the cardenolides **8** and **16** are reported.

Auf Grund der bisherigen Erfahrungen nimmt man an, dass für die Herzwirksamkeit der Cardenolide die folgenden strukturellen und stereochemischen Bedingungen erfüllt sein müssen [2]: 3β -Hydroxygruppe, *cis*-Verknüpfung der Ringe C und D, 14-Hydroxygruppe und 17β -ständiger Butenolidring. Ob 3-Desoxycardenolide tatsächlich keine cardiotonische Wirkung mehr besitzen, ist allerdings nie experimentell bewiesen worden, da digitaloide Lactone ohne Sauerstofffunktion an C-3 bisher unbekannt sind. Was die Verhältnisse an C-14 betrifft, so zeigte das 14β H-Cardenolid 14-Desoxy-uzarigenin am isolierten Froschherz immer noch cardiotonische Aktivität [3] [4]. Ob das kürzlich beschriebene C/D-*trans*-verknüpfte Cardenolid 14-Desoxy- 14α H-digitoxigenin [5] noch biologisch aktiv ist, entzieht sich unserer Kenntnis. 15α -Hydroxydigitoxigenin wies keine Herzwirksamkeit mehr auf, obwohl die 14β -Hydroxygruppe in dieser Verbindung noch vorhanden ist [4] [6]. Die Beziehungen zwischen Struktur und biologischer Aktivität sind somit noch nicht völlig geklärt. Aus diesen Gründen war es erwünscht, sowohl einen Vertreter der 3-Desoxycardenolide als auch ein Cardenolid mit 14α -ständiger Hydroxylgruppe zu bereiten und biologisch prüfen zu lassen.

Im folgenden berichten wir über die Herstellung des noch unbekannten 14-*epi*-Digitoxigenins (**8**) und des 3-Desoxydigitoxigenins (**16**). Wir versuchten zunächst, die erst genannte Verbindung auf mikrobiologischem Wege zu gewinnen, indem wir 14-Desoxy- 14α H-digitoxigenin (**13**) [5] [7] mit Kulturen von *Mucor parasiticus* und *Absidia orchidis* inkubierten. Von diesen Organismen ist bekannt, dass sie in Androstan- und Pregnanderivaten eine 14α -Hydroxygruppe einzuführen vermögen, sofern die Substrate gewissen strukturellen Voraussetzungen genügen [8]. Die Umsetzungen mit **13** verliefen sehr langsam; doch liessen sich nach einiger Zeit in den Chromatogrammen mehrere langsamer laufende Flecke feststellen. Das nach chromatographischer Reinigung erhaltene krist. Hauptprodukt vom Smp. 246–258° schmolz sehr ähnlich und zeigte die gleichen Laufstrecken wie synthetisch bereitetes 14-*epi*-Digitoxigenin (s. unten). Die IR.-Spektren der beiden Präparate wie auch ihrer Acetylivate ähnelten sich zwar sehr, waren aber doch deutlich verschieden voneinander, sodass es sich beim mikrobiologischen Hydroxylierungsprodukt nicht um das gesuchte 14-*epi*-Digitoxigenin (**8**) handeln kann. Wegen der geringen Mengen konnte die Struktur dieser Verbindung noch nicht ermittelt werden.

Die Herstellung von 14-*epi*-Digitoxigenin (**8**) gelang indessen auf chemischem Wege. Als Ausgangsmaterial für die Synthese diente 3-O-Acetyl-15 α -hydroxy-14-*epi*-digitoxigenin (**1**), das erstmals SCHÜPBACH [9] und später auch OKADA & SAITO [10] durch Umsetzung von 3-O-Acetyl-14-anhydro-digitoxigenin mit OsO₄ bereitet hatten. Es war beabsichtigt, die Sauerstofffunktion an C-15 durch Dehydrierung in eine Oxo-gruppe zu verwandeln und diese *via* Thioketal reduktiv zu entfernen. Die selektive Dehydrierung der 15 α -HO-Gruppe liess sich weder mit CrO₃-Eisessig noch mit CrO₃-H₂SO₄ in Acetonlösung [11] noch mit dem CrO₃-Pyridin-Komplex [12] bewerkstelligen: Entweder trat keine Reaktion oder gleich oxydative Spaltung des Ringes D ein. Zum Erfolg führte jedoch die Umsetzung von **1** mit Dicyclohexylcarbodiimid in Dimethylsulfoxid nach PFITZNER & MOFFATT [13]. Sie lieferte in guter Ausbeute das Keton **4**, das sich ebenso glatt mit Propandithiol-HCl in das Propylendithioketal **5** überführen liess. Sowohl das Massenspektrum (Molekular-Ion bei *m/e* 520 entspr. der Formel C₂₈H₄₀O₅S₂) als auch das IR.-Spektrum (ν (OH) bei 2935 cm⁻¹) zeigten, dass die säureempfindliche 14 α -Hydroxygruppe nicht eliminiert worden ist. Bei dem in geringerer Menge erhaltenen sehr labilen Nebenprodukt, dürfte es sich um ein Anhydro-derivat von **5** handeln. Die gleiche Substanz entstand auch beim Erhitzen des Thioketals **5** auf 150° während 16 Std. bei 0,01 Torr. Die reduktive Entfernung des Propandithiolrests mit RANEY-Nickel wurde zur Schonung des empfindlichen Butenolidrings in Acetonlösung durchgeführt, doch war die Ausbeute an 3-O-Acetyl-14-*epi*-digitoxigenin (**7**) schlecht. Auch stiess die Abspaltung der Acetylgruppe auf unerwartete Schwierigkeiten. Die sonst selektiv verlaufende Umesterung mit HCl-Methanol ergab im Falle von **7** nur Spuren von 14-*epi*-Digitoxigenin (**8**); zur Haupt-sache entstanden zwei weniger polare Produkte, und zwar das 8(14)- oder 14-Anhydro-O-acetylderivat **11** und das entsprechende entacetylierte Eliminationsprodukt **10**. Die Umkehrung der Reaktionsfolge, d.h. zuerst Entacetylierung, dann Entfernung der Thioketalgruppe, führte ebenfalls nicht zum Ziele, indem auch **5** gegenüber Säuren sehr empfindlich war. Die 14 α -Hydroxygruppe ist durch Säuren viel leichter eliminierbar als ein 14 β -Hydroxyl. Andererseits erwies sich das Thioketal **5** als sehr oxydationsempfindlich, indem es sich bereits in Ätherlösung sehr rasch veränderte. Diese Beobachtung erlaubte es, die Klippe der Säureempfindlichkeit zu umgehen, indem **5** bei der Behandlung mit H₂O₂ in Äther in guter Ausbeute ein Produkt lieferte, dessen Analysenwerte auf die um 1 Sauerstoffatom reichere Formel C₂₈H₄₀O₆S₂ passten. Im Massenspektrum war allerdings keine dem Molekular-Ion entsprechende Spitze, sondern nur bei *m/e* 518 das Ion *M*-18 zu erkennen. Es liegt das Sulfoxid **6** mit unbekannter Lage der Sulfoxylgruppe vor. Nach den IR.-Spektren waren der Butenolidring und die Acetylgruppe unverändert. Hingegen fielen die intensivere Absorption der HO-Streckschwingung und das Auftreten zusätzlicher Banden im Gebiet von 1010–1050 cm⁻¹ auf, wie sie für Sulfoxid-Gruppen charakteristisch sind [14]. Die Bildung von Sulfoxiden und Sulfonen aus Äthylenedithioketalen ist bekannt. Sie führt zu einer Stabilisierung der Thioketalschutzgruppe gegenüber Säuren [15]¹⁾. Gleichzeitig wird offenbar auch die 14 α -Hydroxygruppe stabilisiert, vermutlich

¹⁾ Während 3,3-Äthylenedithio-Steroide mit H₂O₂-Eisessig in Disulfone übergehen, liefern 17,17-Äthylenedithio-Steroide, vermutlich wegen sterischer Hinderung, nur Sulfoxide [15]. Sterische Gründe dürften auch bei den Thioketalen **7** und **9** dafür verantwortlich sein, dass die Oxydation auf der Sulfoxidstufe stehenbleibt. Die Sulfon-Gruppierung würde zu viel Platz beanspruchen.



Es bedeuten: $\text{Ac} = \text{CH}_3\text{CO}-$; $\text{Ae} = \text{Diäthyläther}$; $\text{DCC} = \text{Dicyclohexylcarbodiimid}$; $\text{DMSO} = \text{Dimethylsulfoxid}$; $\text{Py} = \text{Pyridin}$.

durch Assoziation an die Sulfoxidgruppe. Infolgedessen liess sich jetzt **6** mit HCl-Methanol glatt und in guter Ausbeute zum Dihydroxy-sulfoxid **9** entacetylieren, das durch Entschwefelung mit RANEY-Nickel das gesuchte 14-*epi*-Digitoxigenin (**8**) ergab. Die Ausbeuten waren in der letzten Stufe weniger gut, da das RANEY-Nickel wegen des ungesättigten Lactonringes nicht zu aktiv sein durfte. Alle spektralen Daten waren mit der Struktur **8** im Einklang, obwohl die C-Werte bei der Verbrennungsanalyse immer zu tief lagen. Behandlung mit Acetanhydrid-Pyridin ergab das Acetyl derivat **7** $C_{25}H_{36}O_5$ (mit stimmenden Analysenwerten). Es war mit dem aus **5** durch reduktive Entschwefelung bereiteten Präparat identisch. – Die oben erwähnte Stabilisierung der 14-Hydroxygruppe durch H-Brückebildung war nicht nur bei **6**, sondern auch beim 3-O-Acetyl-15*α*-hydroxy-14-*epi*-digitoxigenin (**1**) zu beobachten. Die säureempfindlichen Verbindungen **5** und **7** liessen hingegen praktisch keine Assoziation der HO-Gruppe im IR.-Spektrum erkennen, was für die oben angeführten Gründe der Stabilisierung spricht.

Schliesslich wurde noch festgestellt, dass das durch Behandlung mit Dicyclohexylcarbodiimid in Dimethylsulfoxid [13] aus 15*β*-Hydroxy-digitoxigenin (**2**) [9] erhaltene Keton **3**, das inzwischen auch OKADA & SAITO [10] beschrieben haben, sich nicht wie das Isomere **4** in ein Thioketal überführen liess. Die 15-Oxogruppe wird offenbar durch die 14*β*-HO-Gruppe sterisch so stark gehindert, dass die Reaktion ausbleibt.

Für die Herstellung von 3-Desoxydigitoxigenin (**16**) wurde 3-Dehydroaditoxigenin (**12**) mit Propandithiol-HCl behandelt. Es entstanden zwei Produkte. Beim Hauptprodukt handelt es sich um die 14-Anhydro-Verbindung. Das Nebenprodukt war das gewünschte 3,3-Propylendithio-3-desoxy-digitoxigenin (**15**). Es lieferte nach reduktiver Entschwefelung mit RANEY-Nickel in schlechter Ausbeute 3-Desoxy-digitoxigenin (**16**). Die spektralen Eigenschaften waren mit der Struktur dieser Verbindung im Einklang.

Für die 14-Stellung der Doppelbindung im Anhydroderivat **14** sprechen vor allem die Werte der molekularen Drehungsdifferenzen ($\Delta[\Phi]$). Entsteht bei der Elimination der 14*β*-Hydroxygruppe eine $\Delta^{8(14)}$ -Doppelbindung, so verschieben sich die Drehwerte in positiver Richtung, während beim Übergang in die Δ^{14} -ungesättigte Verbindung eine Verschiebung in die negative Richtung zu beobachten ist (vgl. Tab. 1).

Herr Prof. K. REPKE, Berlin, hat die Herzwirksamkeit der neuen Cardenolide geprüft²⁾, indem er ihren Hemmeffekt auf das Adenosintriphosphat-Phosphohydrolase-System (ATPase-Test), das den aktiven Transport von Na^+ und K^+ durch die Zellmembran besorgt, untersucht. (Zur Methodik und für Vergleichswerte vgl. [16].) Die in Tab. 2 zusammengestellten Resultate zeigen, dass bei Umkehrung der Konfiguration an C-14 (14β -OH \rightarrow 14α -OH) die Wirkung vollständig verschwindet, während der Ersatz von 3β -OH durch Wasserstoff im Vergleich zur Umkehrung der Konfiguration des 3-Hydroxyls (3β -OH \rightarrow 3α -OH) nur wenigaktivitätsvermindernd wirkt. Letzteres Ergebnis bestärkt die Auffassung von PORTIUS & REPKE [16], wonach für die hohe Wirksamkeit eine Sauerstofffunktion an C-3 oder ein elektronendichthetes Zentrum nicht erforderlich sind.

²⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. K. REPKE, Berlin, bestens für die biologische Prüfung unserer Substanzen.

Tabelle 1. Differenz der molekularen Drehwerte ($\Delta[\Phi]$)

Verbindung	Stellung der Doppel- bindung	[Φ]	$\Delta[\Phi]$
Digitoxigenin ^{a)}	–	+ 63° (Me) ²⁾	+ 76°
α -Anhydrodigitoxigenin	$\Delta^8(14)$	+ 139° (Me) ²⁾	
β -Anhydrodigitoxigenin	Δ^{14}	– 46° (Me) ²⁾	– 109°
3-O-Acetyl-digitoxigenin	–	+ 75° (Chf) ⁴⁾	+ 88°
3-O-Acetyl- α -anhydro-digitoxigenin	$\Delta^8(14)$	+ 163° (Chf) ²⁾	
3-O-Acetyl- β -anhydro-digitoxigenin	Δ^{14}	– 72° (Chf) ²⁾	
3,3-Propylendithio-3-desoxy- digitoxigenin (15)	–	+ 27° (Chf)	– 20°
3,3-Propylendithio-3-desoxy- 14-anhydro-digitoxigenin (14)	Δ^{14}	+ 7° (Chf)	

^{a)} Für die zugrundeliegenden [α]_D-Werte vgl. HAUSER *et al.* [7]. Es bedeuten: Chf = Chloroform und Me = Methanol.

Tabelle 2. Wirksamkeit im ATPase Test [16]

Verbindung	Konz. (μM)	(NaK)- ATPase Hemmung in %
Digitoxigenin	1,4	50
3-O-Acetyl-digitoxigenin	1,1	50
3-Dehydrodigitoxigenin	4,18	50
3- <i>epi</i> -Digitoxigenin	29,6	50
14- <i>epi</i> -Digitoxigenin (8)	100	0
3-O-Acetyl-14- <i>epi</i> -digitoxigenin (7)	50 ^{a)}	< 5
3-Desoxydigitoxigenin (16)	3,1	50

^{a)} Bei höheren Konzentrationen fällt die Substanz aus.

Wir danken dem «SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG» (Projekte Nr. 3976 und 5286) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze etwa $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Messung der spez. Drehungen und Spektren wurden ca. 2 Std. bei 60–70°/0,02 Torr und zur Elementaranalyse unter den jeweils angegebenen Bedingungen getrocknet. Die Verbrennungsanalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (E. THOMMEN). Die IR.-Spektren wurden entweder mit dem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrometer, Modell 125, oder mit einem BECKMAN-Spektrometer, Modell IR-8, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A-60, im Spektrallaboratorium des Instituts (K. AEGERTER) aufgenommen. Zur Säulenchromatographie nach DUNCAN [17] diente Kieselgel (Korngrösse 0,05–0,20 mm). Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) [18] wurde Kieselgel G als Adsorbens verwendet. Als Flicssmittel dienten die in Klammern angegebenen Lösungsmittel. Die Flecke wurden entweder durch UV.-Licht oder durch J₂-Dämpfe sichtbar gemacht. Für die Papierchromatographie (PC.) wurde Papier WHATMAN Nr.1 verwendet. Als stationäre Phase diente Formamid, als mobile Phase Benzol-Chloroform-(7:5) oder Chloroform. Die Flecke wurden mit KEDDE-Reagens sichtbar gemacht [19].

2. Umsetzung von 14-Desoxy-14 α H-digitoxigenin (**13**) mit Kulturen von *Mucor parasiticus* bzw. *Absidia orchidis*. - 2.1. Vorversuche. Schüttelkulturen von *M. parasiticus* in Kartoffel-Dextrose-Nährlösung [20] oder Mais-Edamin-Nährlösung [21], oder von *A. orchidis* in Mais-Pepton-Nährlösung (3,5% Glucose; 3,0% Pepton; 0,5-0,7% Maislaugenpulver (Corn Steep Solids von STALEY, USA) pro Liter dest. Wasser) wurden mit 14-Desoxy-14 α H-digitoxigenin (**13**) unter verschiedenen Bedingungen vorsetzt und einige Tage bei 27° auf der rotierenden Schüttelmaschine wie üblich [20] [22] inkubiert und aufgearbeitet. Im PC. und DC. wurden jeweils neben Ausgangsmaterial mehrere langsamer laufende KEDDE-positive Flecke festgestellt.

2.2. Hauptversuch. Zu zwanzig 2 Tage alten Schüttelkulturen (100-ml-ERLENMEYER-Kolben mit 20 ml Lösung) von *M. parasiticus*, die in Mais-Edamin-Nährlösung [21] gezüchtet worden waren, wurden je 9,7 mg 14-Desoxy-14 α H-digitoxigenin (**13**), in 1 ml Aceton gelöst, steril gegeben. Nach 7 Tagen, als kein weiterer Umsatz mehr beobachtet worden war, wurde vom Mycel abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde 4mal mit Methylenechlorid-Äthanol-(7:3) ausgeschüttelt (ca. 250 ml total), je 2mal mit 2N HCl, 2N KHCO₃ (Eis) und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft: Rohprodukt 83,4 mg.

Das Mycel wurde mit insgesamt 200 ml Methanol extrahiert, der Extrakt im Vakuum eingeengt, in Wasser aufgenommen und 3mal mit Methylenechlorid-Äthanol-(7:3) ausgeschüttelt, gewaschen und weiter wie oben aufgearbeitet: Rohprodukt 68,0 mg. Da der Mycelextrakt fast nur Ausgangsmaterial enthielt, wurde dasselbe nochmals in einem neuen Pilzansatz als Substrat zugegeben. Inkubation und Aufarbeitung erfolgten wie im ersten Ansatz. Es resultierten aus dem Filtrat 29,8 mg und aus dem Mycel 59,4 mg Rohextrakt.

Auf trennung der Rohextrakte: Nach Prüfung im DC. wurden die Extrakte aus den Filtraten vereinigt und in Methylenechlorid-Methanol-(9:1) gelöst auf eine Dickschichtplatte 15 × 20 cm aufgetragen. Die Platte war beschichtet mit Kieselgel G, welches 3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfon-saures Na als Kontrastmittel für UV. enthielt. Fliessmittel: Chloroform-Isopropanol-(9:1). Zehn voneinander deutlich getrennte Streifen wurden von der Platte isoliert. Die Fraktionen 4-9 waren KEDDE-positiv: Fraktion 4 (14 mg), krist. Edukt (Ausgangsmaterial); Fraktion 5 (3 mg), Gemisch, verworfen; Fraktion 6 (18 mg), nach Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther 12 mg Kristalle vom Smp. 159-161° (KEDDE-negativ); die Fraktionen 7 (16 mg), 8 (16 mg) und 9 (14 mg) waren Gemische und wurden nochmals getrennt auf eine neue Dickschichtplatte (wie oben) aufgetragen. Fliessmittel: Chloroform-Methanol-(85:15). Fraktion 7 ergab fünf Flecke, Fraktion 8 drei und Fraktion 9 vier. Bei allen drei Trennungen waren nur die dritten Flecke (von der Front gerechnet) KEDDE-positiv. Darum wurden nur diese Fraktionen isoliert. Frakt. 7 (3): 5 mg; Frakt. 8 (3): 11 mg; Frakt. 9 (3): 5 mg. Alle drei Fraktionen liessen sich nicht kristallisieren. Da die Fraktionen 7 (3) und 8 (3) im DC. genau gleich liefen, wurden sie vereinigt und nochmals auf Dickschicht chromatographiert. Erhalten wurden die Fraktionen A (2 mg), B (7 mg), C (5 mg). B ergab aus Aceton-Äther 2,5 mg Kristalle vom Smp. 236-248°. Im DC. einheitlich, lief gleich wie 14-*epi*-Digitoxigenin. Nach Umkristallisieren resultierten 1,7 mg vom Smp. 246-256°. Die IR.-Spektren in KBr und CH₂Cl₂ sind sehr ähnlich aber nicht identisch mit denen von 14-*epi*-Digitoxigenin. Das gleiche gilt für die Spektren der entsprechenden Acetyl derivatate.

3. 3-O-Acetyl-15-oxo-14-*epi*-digitoxigenin (**4**) aus **1**. Eine Lösung von 630 mg 3-O-Acetyl-15 α -hydroxy-14-*epi*-digitoxigenin (**1**) in 5 ml trockenem Dimethylsulfoxid wurde nacheinander mit einer Lösung von 1,85 g Dicyclohexylcarbodiimid und 0,24 ml Pyridin in 10 ml Benzol und mit 0,24 ml Trifluoressigsäure versetzt. Beim Stehen bei Raumtemp. schieden sich aus der klaren, farblosen Lösung bald Kristalle ab. Nach 15 Std. wurde mit 25 ml Essigester versetzt und filtriert. Der Filterrückstand war KEDDE-negativ. Das Filtrat wurde 3mal mit Wasser gewaschen, die wässrige Phase 2mal mit Essigester ausgezogen und der Essigesterextrakt im Vakuum abgedampft. Der Rohextrakt (~1 g), welcher nach DC. (Methylenechlorid-Aceton-(85:15)) kein Ausgangsmaterial mehr enthielt, wurde am Kieselgel chromatographiert.

Fraktionen 1-7 (eluiert mit Methylenechlorid-Methanol-(998:2)) ergaben 350 mg KEDDE-negatives Öl, verworfen.

Fraktionen 8-12 (eluiert mit Methylenechlorid-Methanol-(99:1)) ergaben 560 mg krist. Dicyclohexylharnstoff.

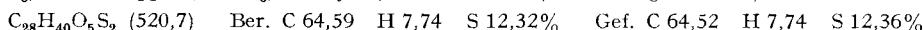
Fraktion 13 (eluiert mit Methylenechlorid-Methanol-(987:13)) ergab 126 mg; nach DC. Di-cyclohexylharnstoff und wenig **4**.

Fraktionen 14–15 (eluiert mit Methylchlorid-Methanol-(985:15)) ergaben 555 mg Kristalle. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol-Methylchlorid-Äther resultierten 460 mg **4** in breiten Nadelchen vom Smp. 273–275°. $[\alpha]_D^{22} = +32,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,472$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: 3575 (OH), 3450 (OH assoz.); 2935 und 2870 (CH); 1785, 1745 und 1730 (C=O); 1630 (C=C) cm^{-1} . UV.-Spektrum (Äthanol) Maxima bei: 215 (4,22); 305 (1,64) nm ($\log e$). Analyse (15 Std. bei 110°/0,01 Torr getrocknet).



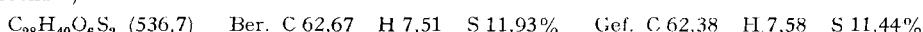
4. 3-O-Acetyl-15-oxo-digitoxigenin (**3**) aus **2**. Eine Lösung von 51 mg 3-O-Acetyl-15β-hydroxy-digitoxigenin (**2**) in 0,5 ml trockenem Dimethylsulfoxid wurde nacheinander mit einer Lösung von 90 mg Dicyclohexylcarbodiimid und 0,012 ml Pyridin in 0,5 ml Benzol und mit 0,007 ml Trifluoressigsäure versetzt. Beim Stehen bei Raumtemp. schieden sich aus der klaren, farblosen Lösung bald Kristalle ab. Nach 20 Std. wurde mit 1 ml Essigester versetzt und abfiltriert. Das Filtrat wurde 3mal mit Wasser gewaschen, die wässrige Phase 2mal mit Essigester ausgezogen und der Essigesterextrakt im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rohextrakt (75 mg), welcher nach DC. (Äther, 2mal auf Front) noch Ausgangsmaterial enthielt, wurde durch präparative DC. (Äther, 2mal auf Front) getrennt. Neben 18 mg rohem Ausgangsmaterial wurden 31 mg Kristalle isoliert, welche nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther 19 mg reines **3** in Prismen vom Smp. 245 bis 248° lieferten. $[\alpha]_D^{23} + 2,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,518$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: 3575 (OH); 3460 (OH assoz.); 2935 und 2875 (CH); 1780 und 1735 (breit, C=O); 1625 mit Schulter bei 1630 (C=C); 1030 cm^{-1} . NMR.-Spektrum (CDCl_3): 1,00 ppm (19- CH_3); 0,933 ppm (18- CH_3). Die isolierten 18 mg Ausgangsmaterial gaben nach Umkristallisieren aus Methanol-Methylchlorid-Äther 12 mg reines **2** in rechtwinkligen Blättchen vom Smp. 250–258°. Ausbeute an **3**: 90% d. Th. bezogen auf umgesetztes **2** und 62% bezogen auf eingesetztes **2**.

5. 3-O-Acetyl-15,15-propylenedithio-14-epi-digitoxigenin (**5**) aus **4**. Durch eine Lösung von 239 mg 3-O-Acetyl-15-oxo-14-epi-digitoxigenin (**4**) in 10 ml Methylchlorid und 1 ml Propandithiol leitete man bei –20° während 1 Std. mit H_2SO_4 gewaschenen Chlorwasserstoff. Dann wurden HCl und Methylchlorid im Vakuum abgedampft und das Propandithiol im Molekulardestillationskolben bei 60–70°/0,2 Torr abdestilliert. Der Rückstand ergab aus Methylchlorid-Pentan 168 mg krist. Rohprodukt, das nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methylchlorid-Äther 73 mg reines **5** in Nadelchen vom Smp. 258–262° lieferte; aus den Mutterlaugen erhielt man durch Chromatographieren an Kieselgel und Eluieren mit Methylchlorid-Methanol-(99:1) noch 41 mg **5**. DC. (Chloroform-Aceton-(85:15)). $[\alpha]_D^{22} = -39,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,503$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: ca. 3500 schwache Absorption (OH stark assoz.); 2935 und 2865 (C–H); 1785, 1750 und 1727 (C=O); 1630 (C=C) cm^{-1} . NMR.-Spektrum (CDCl_3): u.a. Signale bei 1,04 ppm (19- CH_3) und 1,10 ppm (18- CH_3). Analyse (20 Std. bei 100°/0,01 Torr getrocknet):



Als Nebenprodukt wurde eine bei Tageslicht in Lösung, je nach Polarität des Lösungsmittels, violett bis gelb fluoreszierende Substanz erhalten, die aber nicht rein isoliert werden konnte. Dieses Produkt entstand auch bei 16-stdg. Erhitzen von reinem **5** im Hochvakuum auf 150°.

6. 3-O-Acetyl-15,15-propylen-thio-sulfoxy-14-epi-digitoxigenin (**6**) aus **5**. Eine Lösung von 390 mg 3-O-Acetyl-15,15-propylen-dithio-14-epi-digitoxigenin (**5**) in 500 ml Äther wurde mit 0,75 ml 30-proz. wässrigem H_2O_2 versetzt und 24 Std. bei Zimmertemp. gerührt. Dann wurde der Äther abdestilliert und der nach Peroxid riechende Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Er enthielt nach DC. (Chloroform-Aceton-(8:2)) kein Edukt **5** mehr, jedoch noch wenig andere Verunreinigungen. Aus Methanol-Methylchlorid-Äther 301 mg flache Nadeln vom Smp. 206–208°. $[\alpha]_D^{22} = -91,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,613$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: ca. 3340 (starke Absorption: stark assoz. OH); 2930 und 2860 (C–H); 1785, 1750 und 1725 (C=O); 1630 (C=C); 1020 und 1005 ($S \rightarrow O$) cm^{-1} . Massenspektrum: m/e 518 (= $M - 18$). NMR.-Spektrum (CDCl_3): u.a. Signale bei 0,99 ppm (19- CH_3) und 1,115 ppm (18- CH_3). Analyse (15 Std. bei 70°/0,01 Torr getrocknet):



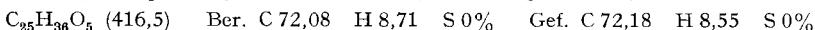
7. 15,15-Propylen-thio-sulfoxy-14-epi-digitoxigenin (**9**) aus **6**. Eine Lösung von 301 mg 3-O-Acetyl-15,15-propylen-thio-sulfoxy-14-epi-digitoxigenin (**6**) in 30 ml Äthanol, wurde mit 7,5 ml 2 N HCl versetzt, 3,5 Tage bei 40° stehengelassen, sodann mit Na_2CO_3 auf pH 7 neutralisiert und

nach Zugabe von ca. 50 ml Wasser mit Methylchlorid extrahiert. Die Extrakte wurden einmal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft: 284 mg Rohprodukt, das aus Aceton-Äther 222 mg Nadeln vom Smp. 231–235° ergab. DC. (Chloroform-Aceton-(7:3)). $[\alpha]_D^{25} = -102^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,750$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: 3600 (OH); ca. 3850 starke Absorption (assoz. OH); 2920 und 2870 (C—H); 1785 und 1750 (C=O); 1630 (C=C); 1010 ($S \rightarrow 0$) cm^{-1} .

8. *14-epi-Digitoxigenin (8) aus 9.* Eine Lösung von 292 mg 15,15-Propylen-thio-sulfoxyl-14-*epi*-digitoxigenin (**9**) in 30 ml Aceton wurde mit 1,15 g RANEY-Nickel versetzt und 3 Std. unter Rückfluss gerührt. Nach Abfiltrieren des Nickels resultierten durch Eindampfen im Vakuum 185 mg Rückstand, welcher nach DC. (Chloroform-Aceton-(7:3)) kein Ausgangsmaterial mehr enthielt. Präparative DC. (Chloroform-Aceton-(85:15)) ergab 45 mg Rohprodukt, das nach nochmaliger präparativer DC. **8** aus Aceton-Äther feine Nadelchen vom Smp. 193–202° lieferte. $[\alpha]_D^{25} = +25,1^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,538$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: 3600 (OH); ca. 3450 (schwache Absorption; assoz. OH); 2930 und 2870 (C—H); 1785 und 1745 (C=O); 1628 (C=C); 1040 cm^{-1} . NMR.-Spektrum (CDCl_3): u.a. Signale bei 1,00 ppm (19- CH_3) und 0,75 ppm (18- CH_3). Analyse (15 Std. bei 120°/0,01 Torr getrocknet):



9. *3-O-Acetyl-14-epi-digitoxigenin (7).* – 9.1. *Aus 3-O-Acetyl-15,15-propylenedithio-14-epi-digitoxygenin (5).* Eine Lösung von 64 mg **5** in 12 ml Aceton wurde mit 820 mg RANEY-Nickel (FLUKA; mit Wasser und Aceton frisch gewaschen) 3 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abfiltrieren des Nickels wurde im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt (40 mg) zeigte im DC. kein Ausgangsmaterial mehr. Durch präparative DC. (Chloroform-Aceton-(85:15)) und Kristallisation aus Methylchlorid wurden 14 mg **7** in Prismen vom Smp. 212–219° erhalten. DC. (Chloroform-Aceton-(85:15)). $[\alpha]_D^{23} = +21,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,585$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: 3600 (starke Absorption; nicht assoz. OH); 2940 und 2870 (C—H); 1785, 1750 und 1725 (C=O); 1630 (C=C); 1040 und 1025 cm^{-1} . UV.-Spektrum (Äthanol) Maxima bei: 218,5 (4,19); 273–274 Schulter (2,18); 337 Schulten (1,88) nm (log ϵ). NMR.-Spektrum (CDCl_3): u.a. Signale bei 1,00 ppm (19- CH_3) und 0,75 ppm (18- CH_3). Analyse (16 Std. bei 80°/0,01 Torr getrocknet):



9.2. *Aus 14-epi-digitoxigenin (8).* 3 mg **8** wurden mit 0,5 ml Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid 29 Std. bei 40° und 2 Tage bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand (1,8 mg) aus Aceton-Äther umkristallisiert: 1,3 mg Kristalle vom Smp. 201–218°. DC. und IR.-Spektrum waren identisch mit DC. und Spektrum des aus **5** gewonnenen Präparates.

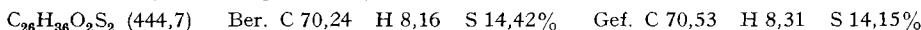
10. *Hydrolyse von 3-O-Acetyl-14-epi-digitoxigenin (7).* Eine Lösung von 20 mg **7** in 4 ml Äthanol wurde mit 1 ml 2N HCl versetzt. Nach 14 Std. Stehen bei 40° wurde mit 2N Na_2CO_3 -Lösung neutralisiert und mit Chloroform ausgezogen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum resultierten 18 mg Rohprodukt, das im DC. (Chloroform-Aceton-(85:15)) wenig Ausgangsmaterial **7**, zwei schneller laufende Flecke A und B und nur wenig Material, das langsamer als **7** lief, (Fleck C) zeigte. Mittels präparativer DC. (Chloroform-Aceton-(85:15)) wurden neben 4 mg Ausgangsmaterial 6 mg 3-O-Acetyl-anhydroderivat **11** (Fleck A), 4 mg Anhydroderivat **10** (Fleck B) und 2 mg entsprechend Fleck C (möglicherweise 14-*epi*-Digitoxigenin (**8**)) isoliert; 3-O-Acetyl-digitoxigenin liess sich unter den gleichen Bedingungen zu ca. 33% zu Digitoxigenin hydrolysieren; der Rest war noch unverändert.

11. *3-Desoxy-3,3-propylendithio-14-anhydro-digitoxigenin (14) und 3-Desoxy-3,3-propylendithio-digitoxigenin (15) aus 12.* Eine Lösung von 273 mg 3-Dehydروdigitoxigenin (**12**) in 15 ml Chloroform wurde mit 1 ml Propandithiol versetzt, dann wurde bei –20° während 30 Min. HCl-Gas durchgeleitet und darauf Methylchlorid und Dithiol im Hochvakuum abdestilliert. Der Rückstand ergab aus Aceton-Äther 295 mg krist. Rohprodukt. Das DC. (Chloroform-Methanol-(97:3)) zeigte ein Gemisch von zwei KEDDE-positiven Substanzen, die durch Kristallisation nicht getrennt werden konnten. Das Gemisch wurde darum an 200 g Kieselgel MERCK (Korngrösse 0,05 bis 0,2 mm) chromatographiert (Fraktionen zu je 500 ml).

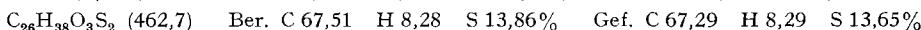
Fraktionen 1–3 (eluiert mit Methylchlorid) ergaben nur Substanzspuren; verworfen.

Fraktionen 4–12 (eluiert mit Methylchlorid) ergaben 98 mg DC.-einheitliches Material, das aus Methylchlorid-Methanol-Äther 39 mg reines 3-Desoxy-3,3-propylendithio-14-anhydro-digi-

toxigenin (**14**) in Nadelchen vom Smp. 259–263° ergab. $[\alpha]_D^{27} = +6,9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,622$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: ca. 3350 (breite Bande, stark assoz.); 2930 und 2870 (C–H); 1783 und 1748 (C=O); 1630 starke Absorption (C=C); 1052, 1035 und 1028 cm^{-1} . Analyse (15 Std. bei 120°/0,01 Torr getrocknet):



Fraktionen 13–27 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(995:5)) ergaben 263 mg. Aus Methylenchlorid-Methanol-Äther 136 mg 3-Desoxy-3,3-propylendithio-digitoxigenin (**15**) in Blättchen vom Smp. 242–245°. $[\alpha]_D^{27} = +273^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,907$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: 3600 (OH); 2930 und 2870 (Schulter) (C–H); 1785 und 1745 (C=O); 1623 und 1635 (Schulter) (C=C); 1030 und 1035 (Schulter) cm^{-1} . Analyse (15 Std. bei 120°/0,01 Torr getrocknet):



12. 3-Desoxy-digitoxigenin (**16**) aus **15**. Eine Lösung von 495 mg 3-Desoxy-3,3-propylendithio-digitoxigenin (**15**) in 35 ml Aceton wurde nach Zugabe von 1,36 g RANEY-Nickel (FLUKA; mit Methanol gewaschen) $3\frac{3}{4}$ Std. unter Rückfluss und Röhren gekocht. Nach Abfiltrieren des Nickels und Eindampfen im Vakuum resultierten 491 mg Rohprodukt, nach DC. (Äther) ein Gemisch von Reaktionsprodukt und Ausgangsmaterial. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methylenchlorid-Äther wurden 243 mg Ausgangsmaterial zurückhalten, welche erneut in 30 ml Aceton mit 1,27 g RANEY-Nickel 6 Std. unter Rückfluss und Röhren gekocht wurden. Das Material beider Reduktionen (396 mg) wurde an 200 g Kieselgel chromatographiert (Fraktionen zu je 500 ml).

Fraktionen 1–10 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(996:4)) ergaben 28 mg Gemisch (im DC. schneller als **16** laufende Flecke).

Fraktionen 11 und 12 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(995:5)) ergaben 78 mg Gemisch von **15** und **16**.

Fraktionen 13–20 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(99:1)) ergaben 199 mg reines Edukt.

Aus den Fraktionen 11 und 12 wurden durch mehrfache präparative DC. (Äther) 61 mg einheitliches **16** gewonnen, die nach Umkristallisieren aus Methanol-Methylenchlorid-Pentan 47 mg reines 3-Desoxydigitoxigenin (**16**) vom Smp. 165–172° lieferte. $[\alpha]_D^{26} = +19,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,473$ in Chloroform). IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) Banden bei: 3600 (OH); 2920 und 2865 (C–H); 1780 und 1740 (C=O); 1621 (C=C); 1030 cm^{-1} . Analyse (14 Std. bei 80°/0,02 Torr getrocknet):



LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 18. Mitteilung: B. PFRUNDER & Ch. TAMM, Helv. 52, 1643 (1969).
- [2] Vgl. Ch. TAMM, Proc. 1st. Internat. Pharmacol. Meeting, Stockholm, Vol. 3, 11 (1963).
- [3] M. OKADA & Y. SAITO, Chem. pharmaceut. Bull. 16, 2223 (1968).
- [4] T. SHIGEI & S. MINESHITA, Experientia 24, 466 (1968).
- [5] T. WADA, Chem. pharmaceut. Bull. 13, 312 (1965).
- [6] H. ISHII, T. TOZYO & D. SATOH, Chem. pharmaceut. Bull. 11, 576 (1963); M. OKADA & M. HANUNAMA, J. pharmac. Soc. (Jap.) 85, 822 (1965).
- [7] E. HAUSER, H. LINDE & K. MEYER, Helv. 49, 1212 (1966).
- [8] a) Vgl. A. ČAPEK, O. HANČ & M. TADRA, «Microbial Transformations of Steroids», Academia, Prag 1966; b) W. CHARNEY & H. L. HERZOG, «Microbial Transformations of Steroids, a Handbook», Academic Press, New York/London 1967; c) H. IIZUKA & N. NAITO, «Microbial Transformation of Steroids and Alkaloids», University of Tokyo Press, Tokyo-University Park Press, State College Pennsylvania 1967.
- [9] M. SCHÜPBACH, Dissertation Basel 1965.
- [10] M. OKADA & Y. SAITO, Chem. pharmaceut. Bull. 15, 352 (1967); 17, 515 (1969).
- [11] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, J. chem. Soc. 1964, 39.
- [12] G. I. POOS, G. E. ARTH, R. E. BEYLER & L. H. SARETT, J. Amer. chem. Soc. 75, 422 (1953).
- [13] K. E. PFITNER & J. G. MOFFATT, J. Amer. chem. Soc. 85, 3027 (1963); 87, 5661, 5670 (1965); A. H. FENSELAU & J. G. MOFFATT, ibid. 88, 1762 (1966); A. F. COOK & J. G. MOFFATT, ibid. 89, 2697 (1967); J. S. BRIMACOMBE, Angew. Chem. 81, 415 (1969).
- [14] D. BARNARD, J. M. FABIAN & H. P. KOCH, J. chem. Soc. 1949, 2442; K. C. SCHREIBER, Analyt. Chemistry 21, 1168 (1949).

- [15] S. J. DAUM & D. R. L. CLARKE, Tetrahedron Letters 1967, 165; Z. VESELY, J. HOLUBEK & J. TROJANEK, Coll. czechosl. chem. Commun. 33, 4047 (1968).
 - [16] H. J. PORTIUS & K. REPKE, Arzneim. Forsch. 14, 1073 (1964).
 - [17] G. R. DUNCAN, J. Chromatography 8, 37 (1962).
 - [18] Vgl. E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1967.
 - [19] Vgl. I. E. BUSK & D. A. H. TAYLOR, Biochem. J. 52, 643 (1952).
 - [20] G. JUHASZ & CH. TAMM, Helv. 44, 1063 (1961).
 - [21] D. H. PETERSON, H. C. MURRAY, S. H. EPSTEIN, L. M. REINEKE, A. WEINTRAUB, P. D. MEISTER & H. M. LEIGH, J. Amer. chem. Soc. 74, 5933 (1952).
 - [22] E. WEISS-BERG & CH. TAMM, Helv. 46, 1166 (1963).
-

245. Rapid Instrumental Nuclear Activation Analysis of Rocks, Cements and Meteorites¹⁾

by A. Wyttensbach

Eidg. Institut für Reaktorforschung Würenlingen, Switzerland

Dedicated to Professor W. FEITKNECHT for his 70th anniversary

(1. X. 69)

Summary. The experimental set-up and the method for γ -spectrum analysis as used in the activation analysis of rocks, cements and meteorites by reactor neutrons are discussed. Rapid non-destructive simultaneous determination of several elements is possible. Fractional percent reproducibility is possible for Al, Na and Mn; the determination of Ca, Mg and V in the samples studied is influenced by the Al- and Mn-content, but reproducibility approaches 1% in favorable cases. Accuracy is generally within the limits set by the reproducibility. The minimum weight of the sample is small (10–40 mg), but the grain-size must be below 150 mesh; in the case of meteorites, a grain-size effect has been demonstrated. Representative results for several standard rocks and cements, for 7 L-chondrites, 2 hyperstene achondrites and separate mineral phases of the Elenovka chondrite are given.

1. Introduction. Nuclear activation analysis (NAA) has long been recognized as a most valuable analytical tool. Its main virtues are sensitivity and freedom from reagent contamination problems. A typical NAA comprises four steps: irradiation of the sample, chemical isolation of the element sought, measurement of the activity and evaluation of the results. The most time consuming of these steps is usually the chemical isolation of the element sought. Although some attempts have been made to render this isolation automatic [1], it seems more promising to omit it altogether, thus making the whole procedure physical; this way of working is usually termed instrumental nuclear activation analysis (INAA).

In comparison to normal NAA, INAA shows in some instances a reduced sensitivity and necessitates a more sophisticated instrumentation and a more complicated evaluation of the results. On the other hand, INAA has very promising features: it can readily be automated, the evaluation of the results can be computerized and the analysis leaves the sample undestroyed.

¹⁾ Auf Englisch veröffentlicht gemäss besonderem Beschluss des Redaktionsteams.