

224. Abbauversuche am Cinobufagin, I. Teil¹⁾Über Krötengifte, 15. Mitteilung²⁾

von Jean-Pierre Ruckstuhl und Kuno Meyer

(29. VIII. 58)

Cinobufagin (V), das Hauptbufogenin der chinesischen Krötengiftdroge Ch'an Su, ist erstmals von SHIMIZU³⁾ als Mischkristallisat mit Cinobufotalin isoliert worden. Die Annahme, dass dieses Bufogenin mit dem von ABEL & MACHT⁴⁾ aus dem Gift von *Bufo marinus* isolierten «Bufagin» identisch sei³⁾⁵⁾⁶⁾, konnte von JENSEN & CHEN⁷⁾ widerlegt werden. Reines und einheitliches Cinobufagin beschrieben zum ersten Male KOTAKE & KUWADA⁸⁾. Die von KOTAKE⁸⁾ und JENSEN & EVANS⁹⁾ vorgeschlagene Bruttoformel $C_{25}H_{32}O_6$ für V ist von CROWFOOT¹⁰⁾¹¹⁾, gestützt auf röntgenographische Messungen auf $C_{26}H_{34}O_6$ abgeändert worden, was mit dem von TSCHESCHE & OFFE¹²⁾ erbrachten Nachweis der Steroidnatur dieses Bufogenins in bester Übereinstimmung steht. 5 der 6 Sauerstoffatome sind bisher in ihrer Funktion eindeutig abgeklärt worden und verteilen sich auf die folgenden Gruppen: ein sekundäres Hydroxyl⁶⁾⁸⁾ (vermutlich an C-3), den Lactonring¹³⁾ und eine Acetoxygruppe¹⁴⁾. Letztere wird schon durch $KHCO_3$ verseift, wodurch IV entsteht, welches identisch ist mit Substanz A aus Ch'an Su¹⁵⁾. Über die Funktion des 6. und letzten Sauerstoffatoms des Cinobufagins vermochten die bisherigen Untersuchungen keine Anhaltspunkte zu liefern. TSCHESCHE & OFFE¹³⁾ haben aus Analogiegründen angenommen, dass dieses in einer tertiären HO-Gruppe an C-14 zu plazieren sei, und schlugen für Cinobufagin die Teilformel I vor. Etwas weiter gingen dann KOTAKE & KUWADA¹⁶⁾ mit dem Formelvorschlag II.

¹⁾ Auszug aus dem 2. Teil der Dissertation JEAN-PIERRE RUCKSTUHL, Basel 1957.

²⁾ 14. Mitt. H. SCHRÖTER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **41**, 720 (1958).

³⁾ S. SHIMIZU, *J. Pharmacol. exp. Therap.* **8**, 347 (1916).

⁴⁾ J. J. ABEL & D. I. MACHT, *J. Pharmacol. exp. Therap.* **3**, 319 (1911–1912).

⁵⁾ K. KODAMA, *Acta Scholae med. Univ. imp. Kioto* **3**, 299 (1920); **4**, 213, 355 (1922); *Chem. Zbl.* **1923**, III, 312.

⁶⁾ M. KOTAKE, *Liebigs Ann. Chem.* **465**, 1 (1928).

⁷⁾ H. JENSEN & K. K. CHEN, *J. biol. Chemistry* **87**, 741 (1930).

⁸⁾ M. KOTAKE & K. KUWADA, *Scient. Pap. Inst. physic. chem. Research (Tokio)* **32**, 1 (1937); *Chem. Zbl.* **1937**, II, 1588.

⁹⁾ H. JENSEN & E. A. EVANS, *J. biol. Chemistry* **104**, 307 (1934).

¹⁰⁾ D. CROWFOOT, *Chemistry & Ind.* **54**, 568 (1935).

¹¹⁾ D. CROWFOOT & H. JENSEN, *J. Amer. chem. Soc.* **58**, 2018 (1936).

¹²⁾ R. TSCHESCHE & H. A. OFFE, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **68**, 1998 (1935).

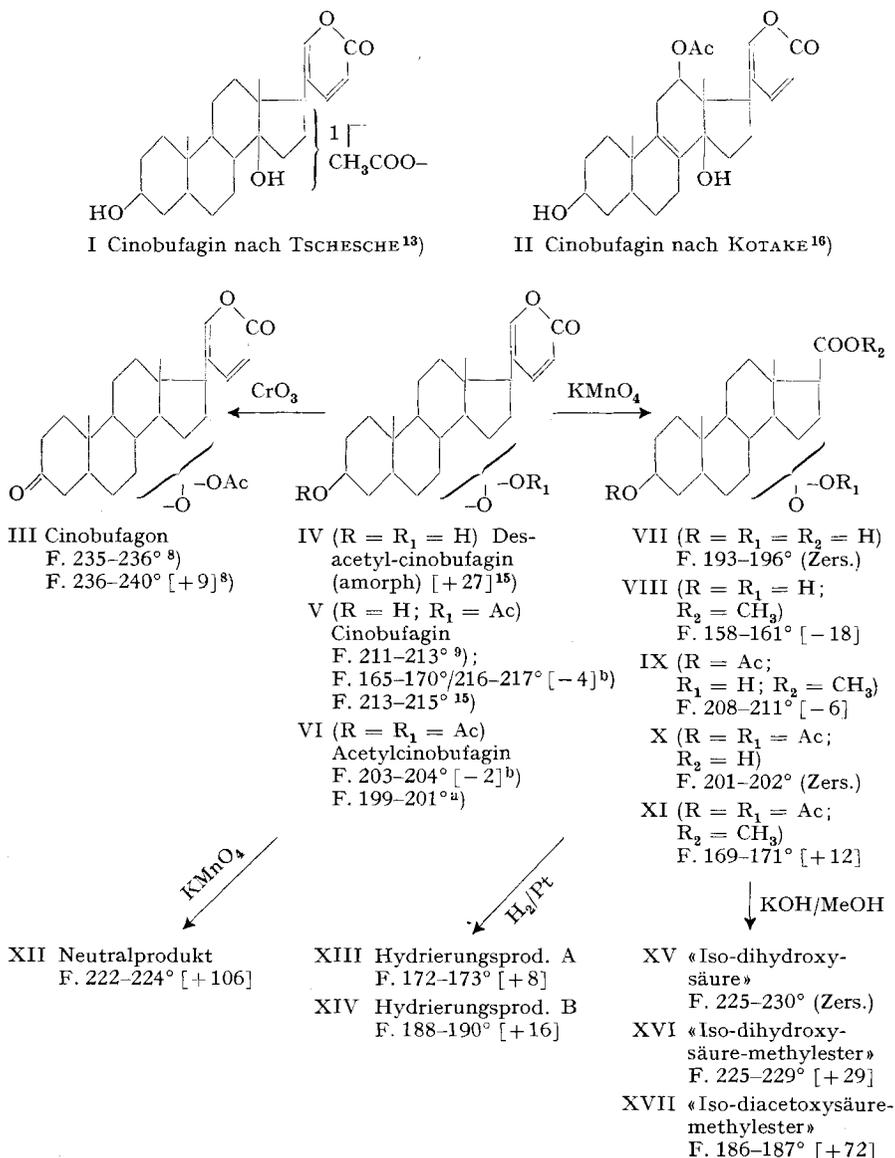
¹³⁾ R. TSCHESCHE & H. A. OFFE, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **69**, 2361 (1936).

¹⁴⁾ H. JENSEN, *Sci.* **75**, 53 (1932); H. JENSEN & E. A. EVANS JR., *J. biol. Chemistry* **104**, 307 (1934).

¹⁵⁾ J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1270 (1957).

¹⁶⁾ K. KUWADA & M. KOTAKE, *Scient. Pap. Inst. physic. chem. Research (Tokio)* **35**, 419 (1938/1939); *Chem. Zbl.* **1939**, II, 1681.

Wenn die von CROWFOOT¹⁰⁾ postulierte Bruttoformel $C_{26}H_{34}O_6$ für Cinobufagin wirklich zutrifft, so müsste dieses Bufogenin (beim Vorliegen des Steroidgerüsts) eine zusätzliche Doppelbindung aufweisen, wie dies in den



Ac = CH_3CO^- . Die Zahlen in eckigen Klammern geben die spez. Drehung für Na-Licht in Chloroform an.

⁸⁾ Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

^{b)} K. MEYER, *Pharmac. Acta Helv.* **24**, 222 (1949).

Formelvorschlägen I und II von TSCHESCHE¹³⁾ und KOTAKE¹⁶⁾ zum Ausdruck kommt, oder aber es müsste eine Carbonylfunktion, d. h. eine Keto- oder Aldehyd-Gruppe oder endlich eine Sauerstoff-Brücke vorliegen, wobei dann allerdings an C-14 keine HO-Gruppe mehr angenommen werden könnte.

Was nun die sowohl von TSCHESCHE als auch von KOTAKE angenommene Doppelbindung betrifft, so ist diese bisher nicht eindeutig nachgewiesen worden. Während in TSCHESCHE's Vorschlag die Lokalisation der Doppelbindung offen gelassen wird, nimmt KOTAKE auf Grund von Farbreaktionen an, dass jene zwischen C-8 und C-9 liegt. Damit besäße das Cinobufagin das gleiche einfach ungesättigte Steroidskelett, wie es z. B. STOLL und Mitarbeiter¹⁷⁾ für den Aglykonanteil des Scillirosids angenommen haben und wie es später auch von TSCHESCHE und Mitarbeitern¹⁸⁾¹⁹⁾ für das genuine Aglykon des Adynerins vorgeschlagen wurde. Da aber Scillirosid zu den cardiotonisch wirksamsten Glykosiden gehört und auch Cinobufagin eine relativ hohe Herzwirksamkeit besitzt, Adynerin aber andererseits unwirksam ist, darf schon auf Grund des völlig verschiedenen pharmakologischen Verhaltens geschlossen werden, dass Scillirosid und Cinobufagin in Bezug auf die Struktur des Steroidgerüsts anders gebaut sein müssen als das Adynerin. Damit sei aber nicht gesagt, dass das Aglykon des Scillirosids die gleichen strukturellen Merkmale aufweise wie Cinobufagin. Im Gegenteil: Cinobufagin unterscheidet sich in einem sehr wesentlichen Punkt von Scillirosid: während letzteres sehr leicht in eine Anhydroverbindung übergeht, konnten wir beim Acetylcinobufagin (VI) feststellen, dass dieses beim Behandeln mit SOCl_2 ²⁰⁾ in Pyridin praktisch unverändert bleibt. Somit kann im Ringsystem des Cinobufagins nicht die von KOTAKE¹⁶⁾ vorgeschlagene Anordnung  enthalten sein, und es folgt des weiteren daraus, dass Cinobufagin offenbar überhaupt gar keine tertiäre HO-Gruppe (z. B. an C-14) aufweist, wie dies bei allen bisher in ihrer Konstitution eindeutig aufgeklärten Herzgiften des Bufo-Scilla-Typs der Fall ist. Diese auf Grund rein chemischer Befunde sich ergebende Folgerung steht in vollständiger Übereinstimmung mit den Resultaten von CARDWELL²¹⁾, der schon vor mehreren Jahren beobachtete, dass die IR.-Spektren des Acetylcinobufagins und seines Abbauesters XI (siehe Fig. 1^{21a)}) keine HO-Bande aufweisen. Dies gilt auch für Cinobufagon (III) (siehe Fig. 2^{21a)}).

Ebensowenig lässt sich eine Doppelbindung auf spektroskopischem Weg nachweisen. Zwar ist Cinobufagin (V) wegen des störenden Einflusses des α -Pyroneinges nicht für solche Messungen geeignet, doch kann hierfür der weiter unten beschriebene, durch Abbau des Acetylcinobufagins (VI) gewonnene

¹⁷⁾ A. STOLL, J. RENZ & A. HELFENSTEIN, *Helv.* **25**, 648 (1943).

¹⁸⁾ R. TSCHESCHE & K. BOHLE, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **71**, 654 (1938).

¹⁹⁾ R. TSCHESCHE & G. SNATZKE, *Chem. Ber.* **88**, 511 (1955).

²⁰⁾ G. DARZENS, *C. r. hebdomadaire séances Acad. Sci.* **152**, 1601 (1911); vgl. auch O. SCHINDLER, *Helv.* **39**, 375 (1956).

²¹⁾ H. M. E. CARDWELL, Privatmitteilung.

^{21a)} Wir danken Herrn Dr. PETER ZOLLER für die Aufnahme und die Interpretation dieses Spektrums.

Ätiansäure-methylester XI benützt werden. Dieser zeigte nun keine selektive Absorption in der für eine isolierte Doppelbindung typischen Region von ca. $200\text{ m}\mu$ ²²⁾.

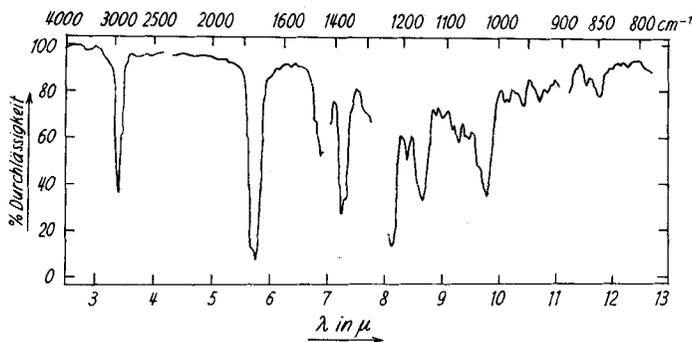


Fig. 1

IR.-Absorptionsspektrum^{21a)} vom Abbaester XI in CH_2Cl_2 . NaCl-Prisma.
PERKIN-ELMER IR.-Spektrophotometer Modell 21

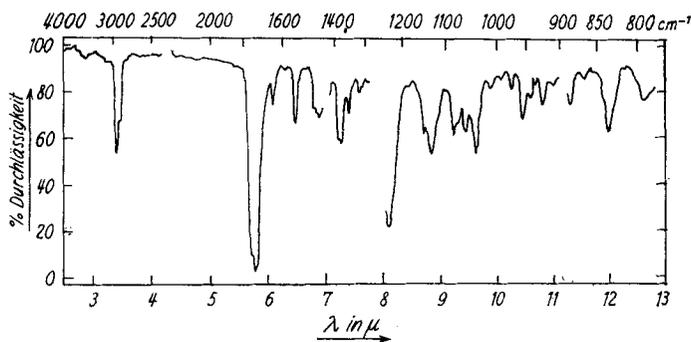


Fig. 2

IR.-Absorptionsspektrum^{21a)} von Cinobufagin (III) in CH_2Cl_2 . NaCl-Prisma.
PERKIN-ELMER IR.-Spektrophotometer Modell 21

Um mit Sicherheit die Anwesenheit einer Aldehyd-Gruppe auszuschliessen, haben wir Cinobufagin in Eisessig mit CrO_3 oxydiert. Wir erhielten dabei praktisch keine Säure. Aus dem rohen Neutralprodukt konnte nach chromatographischer Reinigung in schlechter Ausbeute eine kristallisierte Substanz isoliert werden, die mit dem schon von KOTAKE & KUWADA⁸⁾ beschriebenen Cinobufagin (III) identisch sein dürfte. Da ausserdem Acetylcinobufagin (VI) unter denselben Dehydrierungsbedingungen sich als völlig indifferent erwies, kann eine Aldehyd-Gruppe mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

²²⁾ Wir danken Herrn Dr. PETER ZOLLER bestens für diese Aufnahme, die mit einem «Unicam-SP-500-Spektrophotometer» ausgeführt wurde. Für den kurzwelligen Bereich von 190 bis ca. $205\text{ m}\mu$ wurde eine 0,1-mm-Quarz-Zelle verwendet.

Das Vorliegen einer Keto-Gruppe lässt sich im allgemeinen am einfachsten auf spektroskopischem Wege nachweisen, doch fällt sowohl im UV. wie auch im IR. die intensive Absorptionsbande des doppelt ungesättigten Lactonringes von Cinobufagin und seinen Derivaten in denselben Bereich wie die weit schwächere einer Keto-Gruppe. Der schon oben erwähnte Ätiansäure-methylester XI, von dem angenommen werden kann, dass er in Bezug auf das Ringsystem mit demjenigen des Cinobufagins (V) übereinstimmt, zeigte nun im UV. nicht die Absorptionsbande einer Keto-Gruppe, so dass eine solche für Cinobufagin ausgeschlossen werden kann.

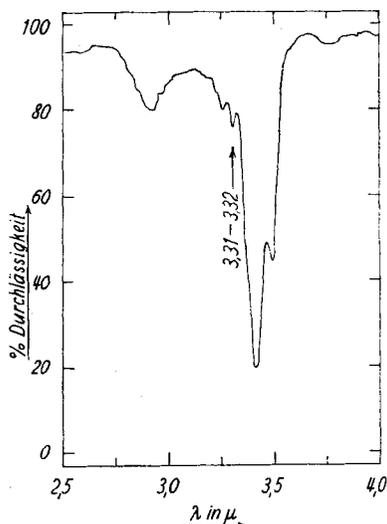


Fig. 3

IR.-Absorptionsspektrum von Acetylcinobufagin (VI) in KBr, aufgenommen von Herrn cand. phil. G. ROTZLER (Organ.-chemische Anstalt der Universität Basel) mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Spektrophotometer, Modell 21 mit CaF_2 -Prisma

Nachdem nun das Vorliegen sowohl einer Doppelbindung wie auch einer Aldehyd- oder Keto-Gruppe im Cinobufagin als ausgeschlossen zu betrachten ist, muss – die Richtigkeit der Bruttoformel $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_6$ vorausgesetzt – das sechste und letzte O-Atom in einem Oxydring enthalten sein. Für das Vorliegen eines Oxydringes spricht die im IR.-Absorptionsspektrum des Acetylcinobufagins (VI) gut sichtbare Bande bei ca. $3,31\ \mu\text{--}3,32\ \mu$ (siehe Fig. 3), die neuerdings der CH-Schwingung einer tertiär-sekundären Epoxy-Gruppe zugeschrieben wird²³⁾²⁾. Zuverlässige Anhaltspunkte für die Lokalisation der Epoxy-Gruppe haben wir noch nicht. Doch vermuten wir, dass der postulierte Oxydsauerstoff an C-14/C-15 fixiert ist.

Abbau des Acetylcinobufagins (VI). Für die Konstitutionsaufklärung der Bufogenine hat sich vor allem der oxydative Abbau mit Kaliumpermanganat

²³⁾ H. HENBEST, G. D. MEAKINS, D. NICHOLLS & K. J. TAYLOR, J. chem. Soc. **1957**, 1459.

in Aceton bewährt, wobei substituierte Ätiansäuren entstehen²⁴⁾25)), die sich für die Abklärung von Funktion und Haftstelle der Sauerstoffatome am tetracyclischen Ringsystem der Steroide als am geeignetsten erwiesen haben.

Wir haben in der vorliegenden Mitteilung erstmals das Aufarbeitsverfahren der Oxydationsansätze etwas modifiziert, indem wir das anfallende MnO_2 mit Hilfe von SO_2 reduzierten, wodurch die Aufarbeitung wesentlich erleichtert wird. (Nähere Einzelheiten siehe im Exper. Teil dieser Arbeit.) Ausserdem können auf diese Weise die Ausbeuten an Abbausäuren etwas verbessert werden.

Das rohe Oxydationsprodukt wurde wie üblich in saure und neutrale Anteile zerlegt. Die neutralen Anteile enthielten jeweils noch Ausgangsmaterial VI. Sie wurden so lange mit $KMnO_4$ in Aceton behandelt, bis sie frei von Acetylcinobufagin (VI) waren. Aus dem auf diese Weise gewonnenen rohen Neutralprodukt liess sich eine einheitliche Substanz XII gewinnen, die im UV. aber keine selektive Absorption zwischen 350–355 $m\mu$ zeigte, die charakteristisch für das 21→14-Lacton einer 14-Hydroxy-20-keto-14 β -pregnan-21-säure ist²⁶⁾27)). Da bisher immer²⁴⁾ aus den neutralen Anteilen der $KMnO_4$ -Oxydation von Acetylbufogeninen, die mit Sicherheit ein 14 β -ständiges Hydroxyl besitzen, dieses für solche Verbindungen typische 21→14-Lacton isoliert werden konnte, stellt nun das Fehlen einer selektiv zwischen 350 und 355 $m\mu$ absorbierenden Substanz in den neutralen Anteilen der $KMnO_4$ -Oxydation des Acetylcinobufagins (VI) ein weiteres (neben dem IR.-Absorptionsspektrum) wichtiges Indiz dafür dar, dass Cinobufagin an C-14 überhaupt keine HO-Gruppe aufweist. Cinobufagin zeigt damit – wenigstens in diesem Punkt – ein ganz analoges Verhalten wie das kürzlich untersuchte Marinoobufagin²⁷⁾ und das Resibufogenin²⁸⁾.

Die eben erwähnte neutrale Substanz XII wies im UV. ein Maximum bei 295 $m\mu$ ($\log \epsilon = 1,70$) auf. XII dürfte also eine Keto-Gruppe aufweisen. Dafür spricht auch das IR.-Spektrum, das 3 Banden in der Gegend der CO-Schwingung zeigte, nämlich bei 5,65 μ (gesättigtes Fünfring-Lacton oder Enolacetat), bei 5,73 μ (Fünfring-Keton) und bei 5,78 μ (Acetatbande)^{21a)}. Bei der Oxyda-

²⁴⁾ ST. PATAKI & K. MEYER, *Helv.* **38**, 1631 (1955), und frühere Arbeiten.

²⁵⁾ Der Abbau mit Ozon, der bei den Cardenoliden die bisher beste Methode zur Gewinnung der Ätiansäuren darstellt (vgl. z. B. ²⁴⁾), führt bei den Bufadienoliden zu 21-Nor-20-keto-cholansäuren (siehe spätere Mitteilung). Frühere Bearbeiter haben eine Konstitutionsaufklärung der Bufadienolide über den Weg der Hydrierung des α -Pyronringes versucht. Dabei entstehen einerseits die entsprechenden gesättigten Lactone, andererseits aber auch infolge reduktiver Aufspaltung des α -Pyronringes substituierte Gallensäuren (vgl. hierzu H. WIELAND, G. HESSE & H. MEYER, *Liebigs Ann. Chem.* **493**, 272 (1937), bzw. A. STOLL, A. HOFFMANN & A. HELFENSTEIN, *Helv.* **18**, 644 (1935); A. STOLL & J. RENZ, *Helv.* **24**, 1380 (1941)). Am Beispiel des Cinobufagins war diese Abbaumethode erfolglos⁶⁾13) und führte schliesslich zu einer unbekanntenen Diketocholeensäure¹⁶⁾.

²⁶⁾ W. SCHLEGEL, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 1013 (1955).

²⁷⁾ ST. PATAKI & K. MEYER, *Helv.* **38**, 1631 (1955).

²⁸⁾ K. MEYER, *Helv.* **35**, 2444 (1952); vgl. auch die Arbeit von H. LINDE & K. MEYER, die demnächst erscheint.

tion von XII mit H_2O_2 in schwach alkalischer Lösung (KHCO_3)²⁹⁾ wurde nur wenig Säure gebildet, deren Methylester auch nach chromatographischer Reinigung nicht kristallisierte.

Aus den sauren Anteilen des KMnO_4 -Abbaus von Acetylcinobufagin liessen sich einheitliche Kristalle gewinnen, die die reine Acetoxysäure X darstellten. Sie gab bei der Methylierung mit ätherischem Diazomethan den kristallisierten Ester XI. Weitere Mengen dieses Esters liessen sich durch Methylierung der amorphen Mutterlaugenrückstände von XI und anschliessende chromatographische Reinigung an Al_2O_3 erhalten. XII stellte die einzige kristallisierte Substanz solcher Chromatogramme dar. Daneben fielen recht beträchtliche Mengen amorpher Produkte an, die nicht weiter untersucht wurden.

Die Analysenergebnisse lassen deutlich erkennen, dass dem Abbauester XI die Bruttoformel $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_7$ zukommt, d. h. die gefundenen Wasserstoffwerte dieses Esters stehen in Übereinstimmung mit dem CROWFOOT'schen Formelvorschlag $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_6$ für Cinobufagin. Das UV.-Spektrum zeigte – wie oben schon ausgeführt – keine selektive Absorption. Auch das IR.-Spektrum wies keine Besonderheiten auf, mit Ausnahme des schon erwähnten Fehlens der HO-Bande. Der Ester XI gab auf Zusatz von Tetranitromethan keine Gelbfärbung und blieb bei der Einwirkung von POCl_3 oder SOCl_2 in Pyridin praktisch unverändert.

Bei der Mikrohydrierung von XI wurde jeweils die Doppelbindungszahl 1 gefunden. Trotz vieler Versuche konnte bei analog durchgeführten *präparativen* Hydrierungen kein eigentliches Hydrierungsprodukt gefasst, sondern nur Ausgangsmaterial XI zurückgewonnen werden³⁰⁾. Wir versuchten deshalb, durch drastischere Bedingungen eine Hydrierung zu erzwingen. Reichliche Mengen PtO_2 in Eisessig, ein Wasserstoffdruck von 80 atü und erhöhte Temperatur führten schliesslich zu einem Hydrierungsprodukt, das aus mindestens 2 Stoffen bestand, die nur mühsam in die Hydrierungssubstanzen A (XIII) und B (XIV) getrennt werden konnten. Auf Grund der gefundenen C- und H-Werte kommt beiden die Formel $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_6$ zu, d. h. sie weisen gegenüber dem Ausgangsester XI ein O-Atom weniger und 2 H-Atome mehr auf. Dieser Befund lässt sich am ehesten damit erklären, dass dieses O-Atom in einem Oxydring enthalten war und nach Aufhydrierung des letzteren als H_2O zur Eliminierung kam, worauf Hydrierung der dabei gebildeten Doppelbindung erfolgte.

Wird der Ester XI in wässrig-methanolischer KHCO_3 -Lösung einige Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen, so wird eine Acetyl-Gruppe verseift,

²⁹⁾ Dadurch werden 21 \rightarrow 14-Lactone vom Typus oben erwähnter Pregnansäuren zu den entsprechenden Ätiansäuren abgebaut²⁴⁾.

³⁰⁾ In einem Fall liess sich neben viel Ausgangsmaterial eine kleine Menge einer neuen Substanz gewinnen, die sich durch einen wesentlich höheren Smp. und eine geringere Löslichkeit vom Ausgangsester XI unterschied. Diese Substanz erwies sich in der Folge dann als identisch mit dem Ester IX, der sehr leicht aus dem Ester XI durch partielle Verseifung mit KHCO_3 entsteht (siehe weiter unten). Eine Erklärung für dieses merkwürdige Resultat lässt sich im Moment nicht geben. Möglicherweise war während der Aufarbeitung ein Teil der Substanz partiell desacetyliert worden. Dies vermag aber den beobachteten Verbrauch an Wasserstoff bei der Hydrierung nicht zu erklären.

und es bildet sich der Hydroxyester IX. Zum Unterschied zum Ester XI zeigt der Ester IX im IR. eine HO-Bande, was zu erwarten war. Die Analyse passte sehr gut auf die berechnete Formel $C_{23}H_{34}O_6$. Rückacetylierung gab in quantitativer Ausbeute den Ester XI. Die leichte, schon mit $KHCO_3$ erzielbare Verseifung einer Acetoxy-Gruppe – es handelt sich dabei um die ursprünglich im Cinobufagin enthaltene Ester-Gruppe³¹⁾ – spricht dafür, dass diese an C-16 zu lokalisieren ist³²⁾.

Verseifung der oben erwähnten, durch $KMnO_4$ -Oxydation des Acetylcinobufagins erhaltenen Abbausäure X, die eine Diacetoxyssäure darstellt, mit KOH in wässrigem Methanol gab einheitlich die kristallisierte Dihydroxyssäure VII vom Smp. 193–196° (Zers.), deren Methylester VIII ebenfalls in Kristallen vom Smp. 158–161° gewonnen werden konnte. Acetylierung von VIII lieferte den oben erwähnten Diacetoxyester XI. Während der alkalischen Verseifung der Abbausäure X ist somit *keine* Umlagerung eingetreten.

Wesentlich anders verhält sich der Methylester XI von X bei der Verseifung mit KOH in wässrigem Methanol: es entsteht ein Gemisch zweier Dihydroxyssäuren, deren Löslichkeit in Chloroform sehr verschieden ist, wodurch eine Trennung der beiden Säuren schon mit Hilfe des Ausschüttelungsverfahrens möglich wird. Die in Chloroform *leicht lösliche* Säure erwies sich als identisch mit der oben beschriebenen Dihydroxyssäure VII. Die in Chloroform *schwer lösliche* Säure gab aus Aceton prismatische Platten vom Smp. 225–230° (Zers.). Wir bezeichnen diese Säure vorläufig als «Iso-dihydroxyssäure» (XV). Ihr Methylester, der «Iso-dihydroxyssäure-methylester» (XVI), schmolz bei 225 – 229° und gab nach Acetylierung den «Iso-diacetoxyssäure-methylester» (XVII) vom Smp. 186–187°. Letzterer unterschied sich sehr deutlich vom Abbauester XI. Der neue Ester XVII besitzt die Formel $C_{25}H_{36}O_7$, ist also isomer mit seiner Muttersubstanz XI. Auch der Methoxylgehalt von XI und XVII ist derselbe.

Die auffallende Tatsache, dass der Methylester der Acetoxyssäure X zum Unterschied zur freien Säure unter der Einwirkung von KOH eine weitgehende Isomerisierung erfährt, ist auch schon beim Abbauester des Acetylresibufogenins beobachtet worden³⁴⁾. Am Beispiel des Esters XVII konnten wir zeigen, dass dieser – zum Unterschied zu seiner Muttersubstanz (Ester XI) – gegenüber KOH ein völlig normales Verhalten zeigt: es tritt lediglich Verseifung der Ester-Gruppen ein, und das aus dem Reaktionsgemisch isolierte saure Produkt ist völlig einheitlich und stellt die «Iso-dihydroxyssäure» (XV) dar. Durch die Isomerisierung ist also eine Stabilisierung der Molekel gegenüber Alkali eingetreten.

³¹⁾ Diese leichte Verseifbarkeit einer Acetoxygruppe ist früher schon am Beispiel des Cinobufagins selbst beobachtet worden¹⁹⁾.

³²⁾ Da zweifelsohne zwischen den einzelnen Bufogeninen genetische Zusammenhänge bestehen, lässt sich auch vermuten, dass Cinobufagin mit Bufotalin, welches letzteres ja ein 16-Acetoxy-bufogenin ist³³⁾, in Bezug auf seine Biogenese aufs engste verknüpft sein dürfte.

³³⁾ K. MEYER, Helv. **32**, 1993 (1949).

³⁴⁾ K. MEYER, Helv. **35**, 2445 (1952).

Es erhebt sich nun die Frage, an welchem Asymmetriezentrum diese Umkehrung erfolgt ist. Wir vermuten, dass diese am C-17 stattgefunden hat; d. h. die an diesem C-Atom fixierte Carbomethoxy-Gruppe, die im Ester XI β -ständig orientiert war³⁵), hat im Ester XVII α -Konfiguration. Gegen diese Annahme spricht allerdings die für XVII ermittelte spez. Drehung, die gegenüber derjenigen des Esters XI eine starke Rechtsverschiebung erfahren hat. Bisher war in der Reihe der Ätiansäuren bei einem Konfigurationswechsel an C-17 eine mehr oder weniger starke Linksverschiebung beobachtet worden³⁶). Wir haben, wie oben erwähnt, am Beispiel des Acetylresibufogenins ja ein ganz analoges Verhalten seines Abbauesters, dessen Konstitution eindeutig als die des 3β -Acetoxy-14,15 β -oxido-ätiansäure-methylester erkannt werden konnte³⁷), bei der Verseifung mit KOH in Methanol feststellen können. Die nähere Untersuchung des dabei gebildeten Isoesters, der ja gegenüber dem normalen (oder Ausgangsester) ebenfalls stärker nach rechts dreht, hat einwandfrei ergeben, dass ihm die Konstitution des 3β -Acetoxy-14,15 β -oxido-17 α -ätiansäure-methylesters zukommt³⁸). Daraus muss der Schluss gezogen werden, dass Ätiansäureester, die eine 14,15 β -Oxidogruppe tragen, bei der Verseifung mit KOH in Methanol eine mehr oder weniger weitgehende Umlagerung an C-17 erfahren, was u. W. bisher bei andern Ätiansäureestern nie beobachtet worden ist³⁹). Des weiteren scheint sich aus unseren bisherigen Befunden abzuzeichnen, dass der 17 α -Ester von 14,15 β -Oxido-ätiansäureestern nicht entsprechend der bisher beobachteten Regel gegenüber dem β -Isomeren eine erhebliche Linksverschiebung der spez. Drehung, sondern im Gegenteil eine mehr oder weniger starke Rechtsverschiebung zeigt.

Im Cinobufagin nehmen wir, wie oben erwähnt, an C-14/C-15 einen Oxydsauerstoff an. Diese Epoxyd-Gruppe muss auch im Abbauester XI enthalten sein^{39a}) und dürfte wie beim Abbauester aus Acetylresibufogenin ver-

³⁵) Dass diese wirklich β -ständig angeordnet ist, dürfte – obwohl bisher nicht streng bewiesen – mit grosser Sicherheit angenommen werden.

³⁶) Vgl. z. B. C. W. SHOPPEE, *Helv.* **23**, 925 (1940); J. VON EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* **27**, 1851 (1944); M. SORKIN & T. REICHSTEIN, *Helv.* **29**, 1209, 1218 (1946); K. MEYER, *Helv.* **30**, 1976 (1947); P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **30**, 2143 (1947); A. BUZAS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **31**, 84 (1948); H. P. SIGG & T. REICHSTEIN, *Helv.* **39**, 1507 (1956); O. SCHINDLER, *Helv.* **39**, 375 (1956); CH. TAMM, G. VOLPP & G. BAUMGARTNER, *Helv.* **40**, 1469 (1957); A. LARDON & T. REICHSTEIN, *Helv.* **41**, 904 (1958).

³⁷) H. LINDE & K. MEYER, *Experientia* **14**, 238 (1958).

³⁸) H. LINDE & K. MEYER, noch unveröffentlichte Versuche.

³⁹) Eine Ausnahme macht der 3β -16 β -Diacetoxy-14 β -hydroxy-ätiansäure-methylester, der unter analogen Bedingungen der alkalischen Verseifung ebenfalls eine Isomerisierung erleidet. Der gebildete Isoester zeigt gegenüber dem normalen Ester auch eine Rechtsverschiebung der spez. Drehung. Ob diese Isomerisierung ebenfalls nur in einer Umkehrung an C-17 besteht, lässt sich im Moment noch nicht sagen.— Unveröffentlichte Versuche von M. ZINGG & K. MEYER, die demnächst hier erscheinen werden.

^{39a}) Das IR.-Absorptionsspektrum von XI zeigt zum Unterschied zu demjenigen von Acetylcinobufagin (siehe Fig. 3) allerdings keine eindeutige Bande zwischen 3,31 μ – 3,32 μ . Wir sind aber überzeugt, dass XI in Bezug auf das Steroidskelett genau gleich gebaut ist wie Acetylcinobufagin (VI). Eine Erklärung für diese Diskrepanz in den IR.-Spektren von VI und XI können wir noch nicht geben.

antwortlich gemacht werden für die leichte durch KOH bewirkte Isomerisierung von XI. Diese Umlagerung kann ihrerseits dann wieder als weitere Stütze für die postulierte Epoxyd-Gruppe im Cinobufagin gelten. Schliesslich muss auch noch darauf hingewiesen werden, dass für den Fall, dass Cinobufagin wirklich eine 16-Acetoxyverbindung ist, wie das oben angedeutet wurde, auch noch an die Möglichkeit gedacht werden muss, dass bei der Einwirkung von Alkali auf den Ester XI ausser einer Umkehrung an C-17 auch eine solche an C-16 erfolgt sein könnte. Dies scheint allerdings wenig wahrscheinlich zu sein, da die 17α - 16β -Verbindung die stabilere sein und deshalb bevorzugt bzw. ausschliesslich entstehen sollte. Wir hoffen, diese noch offenen Fragen, was die Konstitution des Cinobufagins betrifft, in der nächsten Zukunft abklären zu können.

Experimenteller Teil

Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze bis 200° ca. $\pm 2^\circ$, darüber $\pm 3^\circ$. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Äther-Chloroform (4:1), Waschen mit 2-n. HCl (bei CrO_3 -Oxydationen mit 2-n. Schwefelsäure), Wasser, 2-n. Sodalösung und Wasser, Trocknen über Na-Sulfat, Filtrieren und Eindampfen. Substanzproben zur Bestimmung der spez. Drehung wurden jeweils 1 Std. bei 60° und 0,02 Torr getrocknet.

Versuch, aus Acetylcinobufagin (VI) mit SOCl_2 in Pyridin H_2O abzuspalten. 200 mg Acetylcinobufagin vom Smp. 198 – 200° wurden in 3 ml absolutem Pyridin gelöst, auf 0° abgekühlt und mit 3 ml einer bei ca. -20° bereiteten Mischung von SOCl_2 -Pyridin (1:2) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 1 Std. bei 0° , hierauf noch 1 Std. bei 20° stehengelassen und dann mit Eisstückchen vorsichtig zersetzt. Extraktion mit einem Chloroform-Äther-Gemisch-(1:4), Waschen der organischen Schicht mit verd. HCl und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 , Filtrieren und Eindampfen gab unverändertes Ausgangsmaterial.

Cinobufagin (III). 500 mg Cinobufagin (V) vom Smp. 211 – 214° wurden in 5 ml Eisessig gelöst und im Laufe von 3 Std. mit total 6,5 ml 2-proz. CrO_3 -Eisessig-Lösung versetzt. Nach weiteren 3 Std. konnte noch reichlich CrO_3 nachgewiesen werden. Nun wurde mit 5 ml Methanol versetzt und 15 Std. bei 20° stehengelassen. Das nach üblicher Aufarbeitung gewonnene rohe Dehydrierungsprodukt wurde an Al_2O_3 chromatographiert. Es liessen sich dabei nur aus den mit reinem Benzol und Benzol mit steigenden Mengen Chloroform (bis 40%) gewonnenen Eluaten (172 mg) Kristalle gewinnen. Diese gaben nach zweimaligem Umlösen aus Aceton-Äther lange, dünne, zu Büscheln vereinigte Nadeln (total 97 mg) vom Smp. 236 – 240° ; $[\alpha]_D^{19} = +9,25^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,516 in Chloroform). Zur Analyse 4 Std. bei 80° und 0,02 Torr getrocknet.

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (440,52) Ber. C 70,89 H 7,32% Gef. C 70,81 H 7,49%

Einwirkung von CrO_3 auf Acetylcinobufagin (VI). 100 mg Acetylcinobufagin vom Smp. 198 – 200° wurden in 2 ml Eisessig gelöst und mit 1,0 ml 2-proz. CrO_3 -Eisessig-Lösung versetzt. Nach 6 Std. konnte noch deutlich CrO_3 nachgewiesen werden. Übliche Aufarbeitung gab praktisch nur neutrale Substanz, die nach Smp. und Mischprobe unverändertes Ausgangsmaterial VI darstellte.

Abbau von Acetylcinobufagin (VI) mit KMnO_4 in Aceton. – a) *Ohne Reduktion des gebildeten MnO_2 .* 2,5 g Acetylcinobufagin vom Smp. 198 – 200° wurden in 125 ml Aceton gelöst, mit 2,5 g fein gepulvertem KMnO_4 versetzt und $3\frac{1}{2}$ Std. bei 20° auf der Maschine geschüttelt. Nach dieser Zeit war nur noch sehr wenig unverbrauchtes KMnO_4 vorhanden. Das Aceton wurde im Vakuum verjagt, der feinkörnige braune Rückstand im Achatmörser staubfein zerrieben, mit Wasser und einigen Tropfen verd. Schwefelsäure (bis zur

eben deutlich kongosauren Reaktion) versetzt und mit Chloroform extrahiert⁴⁰⁾. Die Chloroformauszüge wurden mit Wasser gewaschen, über Sulfat getrocknet, im Vakuum auf etwa 30 ml eingedampft, mit etwa 100 ml Äther versetzt und hierauf mit Hilfe von verd. Sodalösung in neutrale und saure Anteile zerlegt. Es wurden unter Einschluss von 2 Nachoxydationen der jeweils anfallenden Neutralprodukte die folgenden Ausbeuten erzielt: total 2,005 g rohe Säuren und 260 mg Neutrales.

b) *Mit Reduktion des gebildeten MnO₂*. 1,0 g Acetylcinobufagin (VI) vom Smp. 197 – 200° wurde in 80 ml Aceton gelöst, mit 1,5 g fein gepulvertem KMnO₄ versetzt und 14 Std. bei 20° auf der Maschine geschüttelt. Nach Verdampfen des Acetons im Vakuum wurde der fein zerriebene Rückstand in einem Kolben in ca. 50 ml H₂O suspendiert und mit verd. H₂SO₄ (bis eben kongosauer) versetzt. Nun wurde in langsamem Strom in die auf ca. 0° abgekühlte Suspension reines SO₂ bis zur Sättigung eingeleitet und der Kolben mit einem Stopfen verschlossen. Von Zeit zu Zeit wurde durchgeschüttelt, bis alles MnO₂ sich gelöst hatte und die Suspension rein weiss war. Diese wurde abgenutscht, der Rückstand gründlich mit Wasser gewaschen, in Chloroform-Äther (1:4) (oder Benzol-Äther (1:1)) aufgenommen und mit Hilfe von verd. Sodalösung in neutrale und saure Anteile zerlegt. Erhalten wurden so rund 600 mg rohe Säure und 330 mg Neutralprodukt, welch letzteres zum grössten Teil aus Ausgangsmaterial VI bestand.

Untersuchung des Neutralteiles der KMnO₄-Oxydation von VI; Neutralprodukt XII. Der nach 3 Oxydationen erhaltene, unter a) erwähnte Neutralteil (260 mg) gab nach dreimaligem Umlösen aus Aceton-Äther dünne, lange Nadeln, die bei 222–224° (Sintern ab 212°) schmolzen: XII. Angaben über das UV.- und das IR.-Spektrum finden sich im Theoretischen Teil dieser Arbeit. Mit konz. Schwefelsäure wurden die folgenden Farben beobachtet: hellgelb → dunkelgelb (10 Sek.), orangegelb (1 Min.), rotorange (4 Min.), rostrot (10 Min.), rostbraun (30 Min.), dunkelbraun (2 Std.), hellbraun (3 Std.), hellbraun mit Grüntich (5 Std.). $[\alpha]_D^{20} = +106,0^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,915 in Chloroform). Zur Analyse 3 Std. bei 100° (über P₂O₅) und 0,02 Torr getrocknet.

C₂₃H₃₀O₈ (402,47) Ber. C 68,63 H 7,51% Gef. C 69,03 H 7,87%

Abbau des Neutralproduktes XII mit H₂O₂. 80 mg XII vom Smp. 218–222° wurden in 15 ml tert. Butanol in der Wärme gelöst und nach dem Erkalten mit 75 mg KHCO₃ in 2 ml H₂O + 1,0 ml H₂O₂ (30-proz.) versetzt. Dabei trat lebhaft Gasentwicklung ein, und die Lösung färbte sich leicht rosa. Nach 4 Std. bei 20° war kein H₂O₂ mehr nachweisbar (KI-Stärke-Papier). Nach erneutem Zusatz von 0,5 ml Perhydrol (Gasentwicklung sehr schwach) wurde bei 20° 15 Std. stehengelassen. Das Reaktionsgemisch enthielt noch wenig H₂O₂. Es gab nach dem Einengen im Vakuum, Ansäuern mit HCl, Extraktion mit Chloroform-Äther-(1:4) und Aufteilung in saure und neutrale Anteile mittels verd. Sodalösung 53 mg Neutralprodukt (reines Ausgangsmaterial XII) und 26 mg ätherlösliche saure Anteile. Die sauren Anteile wurden mit ätherischem Diazomethan methyliert, in Pyridin-Acetanhydrid nachacetyliert und an Al₂O₃ chromatographiert. Sämtliche Fraktionen waren ölig und liessen sich auch nach Animpfen mit dem Ester XI (siehe weiter unten) nicht zur Kristallisation bringen.

Acetoxysäure X und Acetoxysäure-methylester XI. Die besten Ausbeuten an XI wurden jeweils beim ersten Oxydationsansatz von VI erzielt. Die durch Nachoxydation der jeweils anfallenden Neutralteile erhaltenen Säuren gaben mehr amorphe Nebenprodukte. Beispiel: aus 1,0 g Acetylcinobufagin (VI) wurden 385 mg rohe Säure und 535 mg neutrale Anteile erhalten. Die rohe Säure wurde in Aceton gelöst und gab auf Zusatz von Äther schön ausgebildete Nadelchen, die beim Umlösen aus Aceton-Äther bei 188–196° (Zers.) schmolzen. Ausbeute: 145 mg X.

Die Mutterlaugen von X wurden vereinigt, mit ätherischer Diazomethanlösung methyliert und an Al₂O₃ chromatographiert. Aus den mit Benzol-Petroläther (1:1), (3:1) und reinem Benzol gewonnenen Eluaten liessen sich total 73 mg Kristalle (prismat. Nadeln) des Esters XI gewinnen, die scharf bei 169–171° schmolzen. $[\alpha]_D^{19} = +9,54^\circ \pm 2^\circ$ (c =

⁴⁰⁾ Eine Schichtentrennung lässt sich meist erst nach Zentrifugieren erzielen.

2,1398 in Chloroform); $+12,3^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,972$ in Chloroform). Zur Analyse 3 Std. bei 80° bzw. bei 100° (über P_2O_5) und 0,02 Torr getrocknet.

$C_{25}H_{36}O_7$	Ber. C 66,94	H 8,09	O 24,97	$-OCH_3$ 6,92	$-COCH_3$ 19,19%
(448,54)	Gef. „ 67,11	„ 8,15	„ 25,03	„ 7,02	„ 17,57%
	Gef. „ 66,99	„ 7,89			
	Gef. „ 66,85	„ 8,24			
	Mittel C 66,98		H 8,09		

Der Ester XI gibt, in wenig $CHCl_3$ gelöst, mit Tetranitromethan keine Gelbfärbung. IR.-Spektrum siehe Theoret. Teil.

Versuche zur Abspaltung von H_2O beim Ester XI. – a) *Mit $POCl_3$ in Pyridin.* 120 mg reiner Ester XI vom Smp. $168-170^\circ$ wurden in 1,5 ml abs. Pyridin und 0,3 ml $POCl_3$ gelöst, mit einem Tröpfchen H_2O versetzt, ca. 1 Min. auf 60° erwärmt und hierauf 15 Std. bei 20° stehengelassen. Pyridin und $POCl_3$ wurden im Vakuum verjagt, der Rückstand in $CHCl_3$ -Äther-Gemisch-(1:4) aufgenommen, dieses mit verd. HCl, verd. Sodalösung und zuletzt mit H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand gab aus Aceton-Äther 102 mg prismat. Nadeln vom Smp. $168-169,5^\circ$ (unverändertes Ausgangsmaterial). Die Mutterlauge (14 mg) kristallisierte durch und zeigte den Smp. $150-167^\circ$; sie gab, in wenig Chloroform gelöst, auf Zusatz von Tetranitromethan eine sehr schwache, aber deutliche Gelbfärbung.

b) *Mit $SOCl_2$ in Pyridin.* 150 mg Ester XI vom Smp. $165-169^\circ$ wurden in 1 ml Pyridin gelöst, auf -25° abgekühlt, mit einem ebenfalls abgekühlten Gemisch von 2 ml Pyridin- $SOCl_2$ -(4:1) versetzt und 2 Std. bei 0° und hierauf noch 1 Std. bei 20° stehengelassen. Nach Zersetzen mit Eisstückchen wurde mit Chloroform-Äther-Gemisch-(1:4) aufgenommen und dieses neutral gewaschen. Es konnten total 142 mg kristallisiertes Ausgangsmaterial XI zurückgewonnen werden, das bis auf einen kleinen Rest, der einen etwas tieferen Smp. aufwies, bei $166-170^\circ$ schmolz.

Hydrierungsversuche. – a) *Mit PtO_2 in Eisessig bei 20° unter Normaldruck.* 50 mg PtO_2, H_2O wurden in 2 ml Eisessig bei 20° vorhydriert, hierauf mit 50,9 mg Ester XI vom Smp. $166-169^\circ$ versetzt und das Ganze 24 Std. unter H_2 -Atmosphäre geschüttelt, wobei 2,10 ml Wasserstoff verbraucht wurden (entspr. 83% der theoretischen Menge für eine Doppelbindung in $C_{25}H_{36}O_7$)⁴¹). Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde der Eisessig im Vakuum durch mehrmaliges Eindampfen und Wiederaufnehmen des Rückstandes in Benzol völlig verjagt. Das rohe Hydrierungsprodukt wurde hierauf an 2 g Al_2O_3 chromatographiert. Benzol-Petroläther-(1:1) eluierten rund 10 mg, die praktisch reines Ausgangsmaterial darstellten. Die Fraktionen mit Benzol-Chloroform-(4:1) bis -(3:7) gaben 27 mg einer neuen Substanz, die z. T. kristallisierte (aus Äther-Pentan 12 mg) und nach zweimaligem Umlösen bei $208-212^\circ$ (Sint. ab 204°) schmolzen (kurze, dicke, sechskantige Prismen); $[\alpha]_D^{25} = -6,2^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,6417$ in Chloroform). Die Substanz erwies sich in allen Punkten als identisch mit dem Ester IX (siehe später). Das IR.-Spektrum zeigte zum Unterschied zum Ausgangsmaterial in der Region von $2,85 \mu$ ein neues Maximum, das durch das Vorliegen einer HO-Gruppe bedingt ist. In einem weiteren Hydrierungsversuch, den wir in analoger Weise selbst durchführten, erhielten wir aus 200 mg Ester XI (100 mg PtO_2, H_2O , 10 ml Eisessig) 195 mg Rohprodukt, das bei der chromatographischen Reinigung keine einheitlichen Kristallisate lieferte. Es wurden deshalb alle Fraktionen wieder vereinigt und wie oben nochmals hydriert. Die anschliessende chromatographische Reinigung an Al_2O_3 gab rund 120 mg Ausgangsmaterial (XI) und 48 mg «Hydrierungsprodukt», das nur z. T. kristallisierte.

b) *Mit PtO_2 in Eisessig bei $60-90^\circ$ unter Druck.* 230 mg Ester XI vom Smp. $167-170^\circ$ wurden in 12 ml Eisessig mit 120 mg PtO_2, H_2O während 24 Std. unter 70–80 Atm. Wasserstoffdruck im Drehautoklaven bei $60-90^\circ$ hydriert. Nach üblicher Aufarbeitung

⁴¹) Diese Hydrierung wurde von Herrn E. THOMMEN im Mikrolabor der Organ.-chemischen Anstalt der Universität Basel ausgeführt.

wurde das Rohprodukt an 9,0 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Benzol-Petroläther (1:1) und -(3:1) eluierte Substanz zeigte einen sehr unscharfen Smp. Durch fraktionierte Kristallisation aus Äther-Petroläther liessen sich dünne, glänzende, lange Nadeln gewinnen, die bei 172–173° schmolzen: Hydrierungsprodukt A (XIII). $[\alpha]_D^{20} = +8,4^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,9536$ in Chloroform). Misch-Smp. mit dem Ester XI vom Smp. 168–170°: 150–167°. Zur Analyse 2 Tage bei 20° (über P_2O_5) im Vakuum getrocknet.

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (434,55) Ber. C 69,09 H 8,81% Gef. C 69,03 H 8,81%

Aus der Mutterlauge von XIII kristallisierte nach dem Aufnehmen in Petroläther eine weitere Substanz, die nach mehrfachem Umlösen aus Äther-Petroläther feine prismat. Nadeln gab, die bei 188–190° schmolzen (XIV); $[\alpha]_D^{20} = +16,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,4578$ in Chloroform). Zur Analyse: 2 Tage bei 20° (über P_2O_5) im Vakuum getrocknet.

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (434,55) Ber. C 69,09 H 8,81% Gef. C 69,09 H 8,90%

Das nach den Substanzen XIII und XIV von der Säule abgelöste Material war amorph und wurde nicht weiter untersucht.

Verseifungsversuche. – a) *Partielle Verseifung des Esters XI mit KHCO_3 zum Ester IX.* 135 mg Acetoxysäure-methylester XI vom Smp. 167–170° wurden in 50 ml Methanol gelöst, mit einer Lösung von 500 mg KHCO_3 in 20 ml Wasser versetzt und 5 Tage bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde mit verd. HCl schwach sauer gemacht und das Methanol im Vakuum verjagt. Der wässrige Rückstand gab nach dem Ausziehen mit Chloroform 120 mg Rohprodukt, das aus Aceton-Äther spontan kristallisierte. Es wurde zur weiteren Reinigung an Al_2O_3 chromatographiert. Das mit Benzol und Benzol-Chloroform-Gemischen eluierte Material (IX) gab aus Aceton-Äther kurze, dicke Prismen vom Smp. 208 – 211° (Sint. ab 202°); $[\alpha]_D^{20} = -10,7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,267$ in Chloroform). Zur Analyse 4 Std. bei 80° (über P_2O_5)/0,02 Torr getrocknet.

$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_6$ (406,50) Ber. C 67,87 H 8,57% Gef. C 67,95 H 8,43%

Bei der Rückacetylierung des Esters IX vom Smp. 208–211° in Acetanhydrid/Pyridin wurde in praktisch quantitativer Ausbeute der Ester XI vom Smp. 168–170° erhalten.

b) *Verseifung der Acetoxysäure X mit KOH: Dihydroxysäure VII.* 200 mg Säure X vom Smp. 188–196° (Zers.) wurden in der Lösung von 1,0 g KOH in 5 ml 80-proz. Methanol 3 Std. auf dem Dampfbad unter Rückfluss gekocht. Beim Verjagen des Methanols im Vakuum schied sich das K-Salz von VII aus. Es wurde mit der eben nötigen Menge Wasser in Lösung gebracht und die freie Säure hierauf durch vorsichtiges Zutropfen von verd. HCl (bis zur eben kongosauen Reaktion) ausgefällt. Die Fällung gab nach dem Absaugen, Waschen mit H_2O und Trocknen 138 mg Rohprodukt. Aus Aceton schöne, dünne, lange Prismen, die bei 193–196° (unter Gasentwicklung) schmolzen (120 mg). Die wässrige Lösung der obigen Fällung wurde mit Chloroform erschöpfend extrahiert und gab noch 20 mg VII. Total somit 158 mg (statt 161 mg wie berechnet).

Hydroxymethylester VIII. 800 mg Hydroxysäure VII wurden in wenig Methanol gelöst und in üblicher Weise mit ätherischer Diazomethanlösung methyliert. Der rohe Methylester wurde an 30 g Al_2O_3 chromatographiert. Aus den mit den Gemischen Benzol-Chloroform-(2:3) bis Chloroform-Methanol-(99:1) gewonnenen Fraktionen konnten total 709 mg reinsten Esters VIII in schön ausgebildeten Tetraedern vom Smp. 158–161° gewonnen werden; $[\alpha]_D^{18} = -17,7^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,811$ in Chloroform). Zur Analyse 4 Std. bei 60° und 0,02 Torr getrocknet.

$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (364,46) Ber. C 69,20 H 8,85% Gef. C 69,02 H 8,92%

Acetylierung von VIII in Pyridin/Acetanhydrid gab in quantitativer Ausbeute den reinen Ester XI.

c) *Verseifung des Acetoxysäure-methylesters XI mit KOH.* 270 mg Acetoxysäure-methylester XI wurden in 5 ml Methanol gelöst, mit 2,5 ml 50-proz. KOH versetzt und 3 Std. auf dem Dampfbad unter Rückfluss gekocht. Nach dem Verjagen des Methanols im Vakuum wurde mit HCl eben kongosauer gemacht und die wässrige Suspension sechsmal mit Chloroform extrahiert. Der letzte Chloroformauszug enthielt nur noch

Spuren Substanz. Die vereinigten Chloroformauszüge gaben 135 mg rohe Säure. Aus Aceton wurden 70 mg Prismen vom Smp. 193–196° (Zers.) erhalten, die sich als identisch erwiesen mit der Hydroxysäure VII. Die Mutterlauge von VII wurde methyliert und acetyliert und gab nach chromatographischer Reinigung praktisch ausschliesslich den Ester XI.

«*Iso-dihydroxysäure*» (XV) und «*Iso-dihydroxysäure-methylester*» (XVI). Die mit Chloroform nicht ausschüttelbaren Anteile der obigen wässerigen Suspension wurden durch Absaugen isoliert, getrocknet (98 mg) und gaben aus Aceton prismat. Platten, die bei etwa 225–230° (Zers. und Gelbfärbung) schmolzen: *Iso-dihydroxysäure* XV. Methylierung mit Diazomethan und Umlösen aus Aceton gab XVI in Platten (beidseits stumpf zugespitzt) vom Smp. 225–229°; $[\alpha]_D^{21} = +29^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,9846$ in Chloroform). Zur Analyse 4 Std. bei 80° (über P_2O_5) und 0,02 Torr getrocknet.

$C_{21}H_{32}O_5$	Ber. C 69,20	H 8,85	–OCH ₃ 8,51%
(364,46)	Gef. „ 69,10	„ 8,91	„ 8,61%

«*Iso-diacetoxysäure-methylester*» (XVII). 150 mg des Esters XVI vom Smp. 225–229° wurden in 3 ml Pyridin und 2,1 ml Acetanhydrid 22 Std. bei 35° acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 193 mg Rohprodukt erhalten, die aus Äther-Pentan 153 mg feine, dünne Nadeln vom Smp. 186–187° gaben; $[\alpha]_D^{19} = +73,81^\circ \pm 2^\circ$ bzw. $+71^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,2262$ bzw. 1,485 in Chloroform). Zur Analyse 4 Std. bei 60° (über P_2O_5) und 0,02 Torr bzw. 3 Std. bei 100° (über P_2O_5) und 0,02 Torr getrocknet.

$C_{25}H_{38}O_7$	Ber. C 66,94	H 8,09	–OCH ₃ 6,92%
(448,54)	Gef. „ 67,20; 67,30	„ 8,38; 8,18	„ 6,98%

Verseifung des «Iso-diacetoxysäure-methylester» (XVII) mit KOH. 108 mg Ester XVII vom Smp. 185–187° wurden in 10 ml Methanol gelöst, mit 1,2 ml 50-proz. KOH versetzt, 2 Std. auf dem Dampfbad unter Rückfluss gekocht und dann 38 Std. bei 20° stehengelassen. Nach Verjagen des Methanols im Vakuum, Zufügen von Wasser und Ansäuern mit verd. HCl wurde die ausgeschiedene rohe Säure abgesaugt, mit dest. H₂O gewaschen und getrocknet. Übergossen mit ätherischer Diazomethanlösung und Eindampfen im Vakuum gab den rohen Ester XVI, der an 2,5 g Al₂O₃ chromatographiert wurde. Es wurden total 80 mg Ester XVI eluiert, die nach dem Umlösen aus Aceton-Äther die typischen sechsseitigen Blättchen vom Smp. 222–228° gaben. Misch-Smp. mit dem Ausgangsester XVI 223–227°.

Die Analysen wurden im Mikrolabor (Leitung E. THOMMEN) der Organ.-chemischen Anstalt der Universität Basel ausgeführt.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der hier mitgeteilten vorläufigen Abbauprobe bestätigen die von CROWFOOT aufgestellte Formel $C_{26}H_{34}O_8$ für Cinobufagin und sprechen eindeutig dafür, dass Cinobufagin wie Resibufogenin eine Oxido-Gruppe enthält. Die in Cinobufagin enthaltene Acetoxy-Gruppe dürfte auf Grund ihrer leichten Verseifbarkeit und aus genetischen Gründen am ehesten an C-16 des Steroidgerüsts zu plazieren sein.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel