

Chromatographie der destillierbaren Neutrallteile

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel	Eindampfrückstand				
		roh		Kristalle		
		mg	Habitus	mg	Smp.	Bezeichnung
1-4	Pn	163,5	fluoresz. Öl	—	—	—
5-6	Pn-Hex-(50:50)	16,0	gelbes Öl	} 42,0	100-125°	Substanz α_1
7-10	Pn-Hex-(50:50)	28,5	gelbes Öl			
11	Hex-Bc-(99,5:0,5)	11,0	gelbes Öl			
12-16	Hex-Bc-(99:1) bis - (75:25)	19,5				
17	Hex-Bc-(50:50)	5	gelbes Öl	} 5	140-150°	Substanz α_2
18	Be	10	gelbes Öl			
19-22	Be, Be-Chf, Chf	76,5	braunes Öl	—	—	—

Die Fraktionen 17 und 18 gaben aus Alk 5 mg fast farblose Kristalle. Sie wurden bei 110-125° Badtemp. und 0,02 Torr sublimiert¹⁷⁾. Das Sublimat gab aus Ac 2,6 mg grosse Nadeln, Smp. 135-145°. Umkristallisieren aus Me-Ac lieferte 0,6 mg Subst. α_2 , vom Smp. 147-150°; UV.- und IR.-Spektren vgl. Fig. 1 und 2. Die Substanz ist unlöslich in Pe, schwer löslich in Be und gut löslich in Chf.

Zusammenfassung

Sarcostin wurde mit Selen dehydriert. Dabei entstand ein krist. Kohlenwasserstoff, der sich mit dem JACOBS'Schen Kohlenwasserstoff (III) identifizieren liess. Ausserdem liess sich in sehr geringer Menge ein krist. Keton isolieren, dessen Spektren ungefähr auf ein Fluorenderivat passen würde, das eine nicht konjugierte, offenkettig oder in einem Sechsring gebundene Ketogruppe enthält.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

¹⁷⁾ Wir danken Herrn J. v. EUW bestens für die Reinigung dieser Substanz.

71. Zur Ozonolyse von Bufadienoliden

Über Krötengifte, 16. Mitteilung¹⁾

von **Herbert Schröter** und **Kuno Meyer**

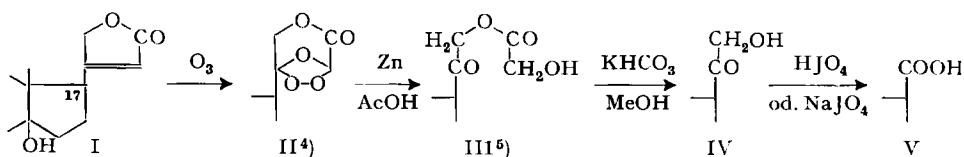
(31. I. 59)

Für die Überführung herzwirksamer Genine vom Typus der Cardenolide in die ihnen zugrunde liegenden Steroidsäuren hat sich der erstmals von MEYER & REICHSTEIN²⁾ beschriebene Abbau mit Ozon besonders bewährt, da sich dabei bedeutend bessere Ausbeuten an kristallisierten Ätiansäuren erzielen lassen als beim Abbau mit KMnO_4 in Aceton³⁾. Für die Gewinnung der Ätiansäuren aus den Carden-(20:22)-oliden sind nach der Ozonmethode²⁾ die folgenden Stufen zu durchlaufen:

¹⁾ 15. Mitt. J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* **41**, 2121 (1958).

²⁾ K. MEYER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **30**, 1508 (1947).

³⁾ M. STEIGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **21**, 828 (1938); F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **28**, 1472 (1945).



In Analogie dazu sollte der Ozonabbau der Bufadien-(20,22)-olide zu dem der Stufe IV entsprechenden 20-Keto-21-aldehyd⁶⁾ führen⁷⁾, der durch weiteren Abbau leicht die diesem Aldehyd zugrunde liegende Ätiansäure ergeben müsste. Am Beispiel des Acetylbufalins (VI) war aber gefunden worden⁸⁾, dass nach reduktiver Spaltung des Ozonids (entsprechende Stufe II → III) neben grösstenteils amorphen Neutralprodukten bereits grosse Mengen Säuren gebildet werden, aus denen nach Methylierung der kristallisierte Ester XI gewonnen werden konnte, der auf Grund der Verbrennungsergebnisse isomer zu sein schien mit dem durch Abbau mit KMnO_4 aus VI erhaltenen 3β -Acetoxy-14 β -hydroxy-ätiansäure-methylester $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_5$. Es ergab sich nun, dass der Ester XI in Wirklichkeit die früher schon in Erwägung gezogene Zusammensetzung $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_6$ und nicht diejenige des eben erwähnten Ätiansäureesters $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_5$ besitzt.

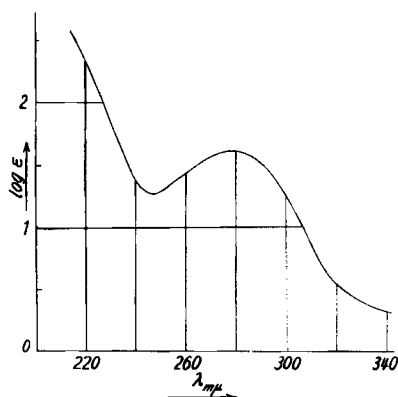


Fig. 1. UV.-Spektrum von 3β -Acetoxy-14 β -hydroxy-20-keto-21-nor-cholansäure-methylester (XI) in Alkohol

Maximum bei $280 \text{ m}\mu$ und $\log \epsilon = 1,60$, ber. auf $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_6$ (448,58)

Zunächst stellten wir fest, dass der Ester XI im UV. bei $280 \text{ m}\mu$ ein schwaches Maximum zeigte (Fig. 1), wie es für Verbindungen mit einer gesättigten Ketogruppe typisch ist. Auch im IR. (Fig. 2) konnte die für eine aliphatische Ketogruppe charakteristische Bande beobachtet werden, die allerdings gegenüber der Norm (5,80 bis

⁴⁾ Formulierung des Ozonids nach H. STAUDINGER, Ber. deutsch. chem. Ges. **58**, 1088 (1925). Vgl. auch R. CRIEGEE, Liebigs Ann. Chem. **583**, I (1953).

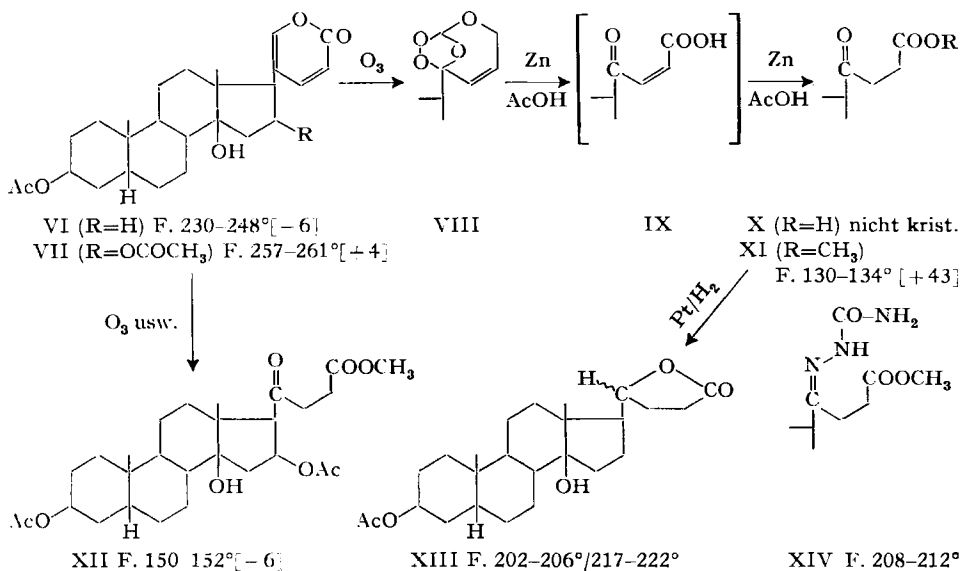
⁵⁾ Formulierung des aus dem Ozonid mit Zn in AcOH erhaltenen Produktes als Glykolsäureester, entsprechend den Befunden von ZINGG & MEYER (siehe spätere Mitteilung).

⁶⁾ Diese Bezeichnung ist formal richtig. Das die Aldehydgruppe bildende C-Atom ist aber das C-22-Atom des Hexadienolid-Ringes.

⁷⁾ Natürlich nur unter der Annahme, dass beide Doppelbindungen des α -Pyrone-Ringes durch Ozon angegriffen werden.

⁸⁾ K. MEYER, Helv. **32**, 1238 (1949).

5,86 μ) infolge Assoziation (vermutlich mit der 14-ständigen HO-Gruppe, deren Bande dadurch ebenfalls eine Verschiebung von 2,80 μ nach 2,95 μ erfährt) nach etwa 5,88 μ verlagert ist. Ein ganz analoges spektrales Verhalten zeigte auch der aus Acetylbutofalin (VII) durch Ozonolyse gewonnene 16-Acetoxyester XII. In Übereinstimmung damit zeigte der Ester XI eine positive LEGAL-Reaktion und gab (allerdings in schlechter Ausbeute) ein Semicarbazon, dessen Stickstoffgehalt sehr gut auf die Formel $C_{27}H_{43}O_6N_3$ stimmte. Bei der Hydrierung des Esters XI mit PtO_2, H_2O in Eisessig wurde unter intramolekularer Abspaltung von Methanol das Lacton XIII



gebildet, dessen IR.-Spektrum die für γ -Lactone typische Bande bei 5,66 μ aufweist (Fig. 3). Daraus folgt, dass es sich bei XI um einen γ -Ketocarbonsäureester handelt, dem die Konstitution des β -Acetoxy-14 β -hydroxy-20-keto-21-nor-cholansäure-methylesters (XI) zukommen muss.

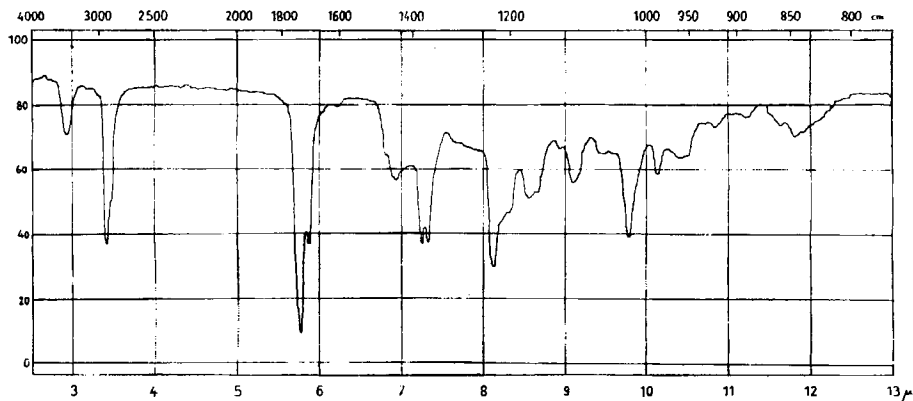


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von β -Acetoxy-14 β -hydroxy-20-keto-21-nor-cholansäure-methylester (XI) in CH_2Cl_2 , $c = 0,0625$ -m., Schichtdicke 0,2 mm

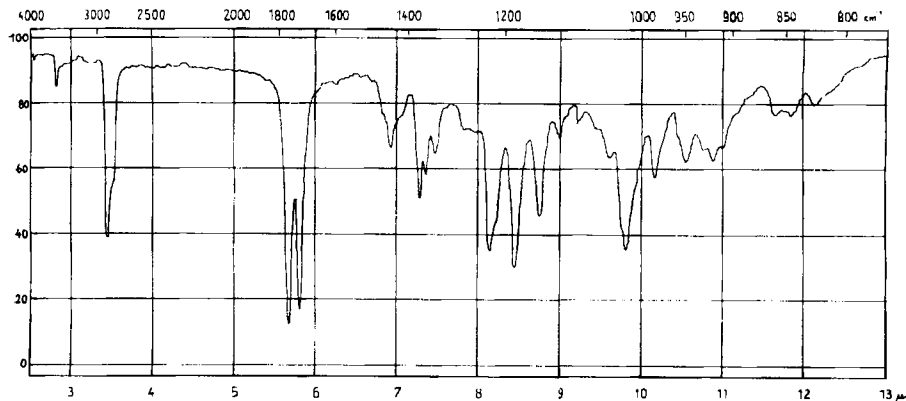


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum von 3β -Acetoxy- 14β -hydroxy- 20ξ -hydroxy- 21 -nor-cholansäure-lacton-($23 \rightarrow 20$) (XIII) in CH_2Cl_2 , $c = 0,0644\text{-m.}$, Schichtdicke $0,2\text{ mm}$

Die bei der Ozonolyse von Acetylbufalin gewonnenen und hier mitgeteilten Ergebnisse gestatten nun auch eine zwanglose Erklärung analoger Befunde früherer Autoren: die von KOTAKE & KUBOTA⁹⁾ aus Diacetyl-gamabufotalin durch Einwirkung von Ozon erhaltene «Diacetyl-ätio-gamabufotalinsäure» der vermeintlichen Formel $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_7$ vom Smp. 225° dürfte in Wirklichkeit (entsprechend der gesicherten Konstitution des Gamabufotalins¹⁰⁾) die Zusammensetzung $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_8$ besitzen und wäre somit als $3\beta,11\alpha$ -Diacetoxy- 14β -hydroxy- 20 -keto- 21 -nor-cholansäure zu bezeichnen. Dem gegenüber muss die von OHNO¹¹⁾ ebenfalls aus Diacetyl-gamabufotalin durch Oxydation mit KMnO_4 in Aceton³⁾ erhaltene Säure vom Smp. 253° , von der der japanische Autor angenommen hatte, dass sie isomer¹²⁾ sei mit der Säure $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_7$ von KOTAKE & KUBOTA⁹⁾, in Wirklichkeit $3\beta,11\alpha$ -Diacetoxy- 14β -hydroxy-ätiansäure¹⁰⁾ sein. Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang die Befunde von OHNO¹¹⁾: Ozonolyse von «Acetyl-pseudo-desacetyl-bufotalin» und nachträgliche Oxydation mit Essigsäure und H_2O_2 gab dieselbe Säure wie die Oxydation mit KMnO_4 . Dies veranlasste uns, die bei der Ozonolyse von Acetylbufalin (VI) erhaltenen Neutralprodukte einer Nachbehandlung mit verschiedenen Oxydationsmitteln zu unterwerfen. Wohl konnten dabei jeweils geringe Mengen Säuren gewonnen werden, doch liess sich in keinem Fall die gesuchte 3β -Acetoxy- 14β -hydroxy-ätiansäure bzw. ihr Methylester fassen.

Der Verlauf der Ozonolyse von Acetylbufalin (VI) und den andern Bufadienoliden kann wie folgt interpretiert werden: in einem ersten Schritt wird die nukleophilere Doppelbindung an C-20/C-21 des Hexadienolid-Ringes angegriffen. Das dabei gebildete Primärozonid geht rasch unter Lösung der C-C-Bindung in das Sekundärozonid über (entsprechend Formel VIII), wobei ein 8gliedriger Ring gebildet wird.

⁹⁾ M. KOTAKE & K. KUBOTA, *Scient. Pap. Inst. phys. chem. Res. (Tokyo)* **34**, 824 (1937/1938); *Chem. Zbl.* **1939**, II, 1681.

¹⁰⁾ K. MEYER, *Helv.* **32**, 1599 (1949).

¹¹⁾ S. OHNO, *J. pharmaceut. Soc. Japan* **60**, 236 (1940); *Chem. Zbl.* **1941**, II, 1399.

¹²⁾ Diese Annahme ist verständlich, da die Bruttoformel $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_8$ eine sehr ähnliche prozentuale Zusammensetzung aufweist wie $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_7$. Demgegenüber ist aber der Methoxylgehalt der Methylester um rund 1% verschieden (vgl. ⁸⁾).

Reduktive Spaltung mit Zink in Eisessig liefert zunächst die ungesättigte Ketosäure IX, welche durch weitere Reduktion in die gesättigte Ketosäure X übergeführt wird¹³). Dieses Resultat zeigt, dass nur die C-20/C-21-ständige Doppelbindung durch Ozon angegriffen wird. Die Resistenz der zwischen C-22 und C-23 liegenden α, β -ungesättigten Doppelbindung im Ozonid VIII gegen weiteren elektrophilen Angriff von Ozon ist in Anbetracht der benachbarten elektroaffinen Carbonyl- bzw. Ozonid-Gruppierung verständlich¹⁴)¹⁵).

Der Direktion der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., BASEL danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimentelles. – Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze bis 200° ca. $\pm 2^\circ$, darüber ca. $\pm 3^\circ$.

β -Acetoxy-14 β -hydroxy-20-keto-21-nor-cholansäure-methylester (XI). Die Gewinnung dieses Esters geschah nach den früher gemachten Angaben⁶). Aus 721 mg Acetylbufalin (VI) wurden 411 mg rohe Säure X und 348 mg neutrale Anteile erhalten. X wurde mit ätherischem Diazomethan methyliert und der rohe Methylester an Al_2O_3 chromatographiert. Es konnten dabei im ganzen 180 mg kristallisierter Ester XI vom Smp. 130–134° gewonnen werden. – Die LEGAL-Probe¹⁶) gab sofort eine intensiv blutrote Färbung. Die UV.- und IR.-Spektren sind im Theoretischen Teil dieser Arbeit wiedergegeben (Fig. 1 und 2).

β , 16 β -Diacetoxy-14 β -hydroxy-20-keto-21-nor-cholansäure-methylester (XII)¹⁷. 202 mg Acetylbufotalin (VII) vom Smp. 257–265° wurden in 20 ml reinem Essigester wie früher⁶) beschrieben ozonisiert und bis zum rohen Reaktionsprodukt aufgearbeitet. Dieses wurde in 50 ml Methanol gelöst, mit einer Lösung von 500 mg Natriumperjodat ($NaJO_4$)¹⁸) in 12 ml Wasser versetzt und 17 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde im Vakuum vom Methanol befreit, die wässrige Lösung mit HCl auf pH = 2 gebracht und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge gaben nach dem Eindampfen 207 mg Rückstand. Dieser wurde in Chloroform-Äther-(1:3) gelöst und mehrmals mit 2-n. Sodalösung und einmal mit Wasser ausgeschüttelt. Die mit Na_2SO_4 getrockneten Chloroform-Äther-Lösungen gaben beim Eindampfen 71 mg neutrales Material (nicht weiter untersucht). Die vereinigten Sodauszüge und Waschwasser gaben nach Ansäuern und Ausschütteln mit Chloroform-Äther-(1:3) 131 mg rohe Säure. Diese wurde mit einigen Tropfen Methanol übergossen, im Überschuss mit ätherischer Diazomethanolösung versetzt und 10 Min. bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und der rohe Ester an 4 g Silicagel chromatographiert. Die mit Benzol-Äther eluierten Anteile gaben aus Äther-Petroläther 65 mg zu Drusen vereinigte Prismen vom Smp. 148–150°. Nach Umkristallisieren stieg der Smp. auf 150–152°; $[\alpha]_D^{25} = -5,7^\circ \pm 1,5^\circ$ (c = 1,885 in Chloroform). LEGAL-Probe: blutrot. Das UV.-Spektrum zeigte völlige Übereinstimmung mit demjenigen des Esters XI. Das IR.-Spektrum wies wie der Ester XI eine nach 5,88 μ verlagerte Ketobande auf.

$C_{28}H_{42}O_8$ (504,62) Ber. C 66,65 H 8,39% Gef. C 66,46 H 8,52%

Semicarbazon des Esters XI (XIV). 30 mg des Esters XI wurden in 0,5 ml Methanol gelöst, mit 1 ml Semicarbazid-Lösung¹⁹) versetzt und über Nacht stehengelassen. Hierauf wurde das Methanol im Vakuum weitgehend verjagt und der Rückstand mit einigen Tropfen Wasser ver-

¹³) W. SCHNEIDEWIND, Ber. deutsch. chem. Ges. **21**, 1323 (1888).

¹⁴) Vgl. hierzu L. LONG, JR., Chem. Rev. **27**, 437 (1940).

¹⁵) Wir möchten Herrn Prof. Dr. C. A. GROB auch an dieser Stelle für die dieses Problem betreffende Diskussion bestens danken.

¹⁶) Ausführungsform siehe bei K. REYLF & T. REICHSTEIN, Helv. **35**, 98 (1952).

¹⁷) Dieser Versuch ist der Dissertation HERBERT SCHRÖTER (Basel 1958) entnommen.

¹⁸) Diese Behandlung ist im Falle der Ozonolyse von Bufadien-(20,22)-oliden vermutlich unnötig. Ob sie auf das Endergebnis von Einfluss ist, wurde nicht untersucht. Sie wurde unternommen, um einen evtl. entstandenen α -Ketoaldehyd zur Ätiansäurestufe abzubauen.

¹⁹) 1,5 g krist. Na-Acetat und 1,0 g Semicarbazid-HCl werden im Mörser fein zerrieben und allmählich unter Umrühren mit 10 ml Methanol versetzt. Hierauf wird durch ein Faltenfilter filtriert.

setzt. Das ausgeschiedene Rohprodukt wurde abgesaugt und aus verdünntem Methanol umkristallisiert. Es konnten nur 7 mg Kristalle (Nadeln) vom Smp. 208–212° gewonnen werden.

$C_{27}H_{43}O_6N_3$ (505,64) Ber. N 8,35% Gef. N 8,45%

3β-Acetoxy-14β-hydroxy-20ξ-hydroxy-21-nor-cholansäure-lacton-(23 → 20) (XIII). 70 mg des Esters XI vom Smp. 130–134° wurden in 3 ml reinem Eisessig gelöst und mit 20 mg PtO_2, H_2O bei Normaldruck in Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Die H_2 -Aufnahme war nach 40 Min. beendet und betrug 8,8 ml (berechnet 7,2 ml). Das nach üblicher Aufarbeitung gewonnene rohe Hydrierungsprodukt war neutral und gab aus Aceton-Äther-Petroläther 36 mg feine zu Drusen vereinigte Nadeln vom Smp. 198–223°. Nach dem Umlösen aus Aceton-Äther-Petroläther wies das Lacton XIII den Doppel-Smp. 202–206°/217–222° auf. Da XIII vermutlich ein Gemisch der beiden an C-20 epimeren Lactone darstellt, wurde auf die Bestimmung der spez. Drehung verzichtet.

$C_{25}H_{38}O_5$ (418,55) Ber. C 71,74 H 9,15 $-OCH_3$ 00% Gef. C 71,75 H 9,36 $-OCH_3$ 00%

Das IR.-Spektrum (Fig. 3) ist im Theoret. Teil wiedergegeben. Die HO-Bande liegt zum Unterschied zu derjenigen des Esters XI bei 2,81 μ (keine Assoziation).

Die Analysen wurden im Mikrolabor (Leitung E. THOMMEN) und die Aufnahmen der IR.-Spektrern im Spektrollabor (G. ROTZLER) der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel ausgeführt.

Zusammenfassung

Bei der Einwirkung von Ozon auf Bufadienolide und anschliessender reduktiver Spaltung der dabei gebildeten Ozonide werden neben Neutralstoffen auch reichliche Mengen von Säuren gebildet, aus denen keine Ätiansäuren, sondern nur 20-Keto-21-nor-cholansäuren isoliert werden konnten. Ozon greift somit nur die sekundär-tertiäre Doppelbindung des zweifach ungesättigten Lactonringes der Bufadienolide an.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel

72. Oxalacetat-Carboxylase und Biotin

von G. Semenza, L. S. Prestidge, D. Ménard-Jeker und M. Bettex-Galland

(3. II. 59)

Eine Reihe von Carboxylierungs- und CO_2 -Übertragungsreaktionen scheinen biotinabhängig zu sein. In den meisten Fällen weiss man jedoch noch nicht, auf welche Weise das Biotin in die Reaktion eingreift. Gewöhnlich kann die Aktivität der zellfreien Fermentpräparate aus Mangeltieren durch Zugabe von Biotin oder normalen Gewebsextrakten nicht wieder hergestellt werden. In verschiedenen Fällen konnte gezeigt werden, dass die gereinigten Enzyme kein Biotin oder nur eine unbedeutende Menge davon enthielten: so zum Beispiel das «malic enzyme» OCHOA's¹⁾, die Carbamylphosphat-Citrullin-Transcarbamylase aus *Lactobacillus arabinosus*³⁾, die

¹⁾ S. OCHOA, A. MEHLER, M. L. BLANCHARD, T. H. JUKES, C. E. HOFFMANN & M. REGAN, J. biol. Chemistry **170**, 413 (1947). Später ist jedoch darauf hingewiesen worden, dass die für die Biotinbestimmung verwendete Methode vielleicht nicht geeignet war²⁾.

²⁾ H. C. LICHSTEIN, Vitamins and Hormons **9**, 27 (1951).

³⁾ J. M. RAVEL, M. L. GRONA, J. S. HUMPHREYS & W. SHIVE, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2344 (1958).