

## 29. Konstitution des Cinobufotalins<sup>1)</sup>

Über Krötengifte, 28. Mitteilung<sup>2)</sup>

von Franz Bernoulli, Horst Linde und Kuno Meyer

(6. XII. 61)

Cinobufotalin, das zu etwa 1,0–1,2%<sup>3)</sup> im *Ch'an Su* enthalten ist, wurde erstmals von KOTAKE & KUWADA<sup>4)</sup> in einheitlichen Kristallen gewonnen und als neuer Bestandteil der chinesischen Krötengiftdroge erkannt<sup>5)</sup>. Die erwähnten Autoren nahmen zunächst<sup>4)</sup> an, dass dieses Bufogenin die Bruttoformel  $C_{23}H_{32}O_6$  und sein Acetylprodukt die Zusammensetzung  $C_{27}H_{36}O_8$  habe, änderten diese Formeln aber kurz darauf<sup>7)</sup> in  $C_{26}H_{36}O_7$  bzw.  $C_{30}O_{40}O_9$  ab und brachten gleichzeitig die Struktur I für Cinobufotalin in Vorschlag. Später<sup>8)</sup> wiesen die genannten japanischen Forscher dann der Acetylverbindung des Cinobufotalins die Zusammensetzung  $C_{28}H_{38}O_8$  zu und diskutierten die Konstitution II für Cinobufotalin<sup>9)</sup>. – Cinobufotalin ist aus *Ch'an Su* auch von MEYER<sup>6)</sup> in einheitlichen Kristallen isoliert und durch seine Acetylverbindung charakterisiert worden. Die damals<sup>6)</sup> für das freie Bufogenin und seine Acetylverbindung ermittelten C-, H- und Acetyl-Werte machten die Bruttoformel  $C_{26}H_{34}O_7$  bzw.  $C_{28}H_{36}O_8$  mit 1 bzw. 2 Acetoxygruppen wahrscheinlich. (Eine Wiederholung der Analyse der Acetylverbindung ergab nun Werte, die gut auf  $C_{28}H_{36}O_8$  passten.) Wenn diese Formulierung richtig ist, würde sich Cinobufotalin vom Cinobufagin (III), dessen Konstitution kürzlich aufgeklärt worden ist<sup>9a)</sup>, nur durch den Mehrgehalt eines Sauerstoffatoms unterscheiden. Das IR.-Absorptionsspektrum von Acetylcinobufotalin (in KBr mit  $CaF_2$ -Prisma aufgenommen) weist als besonderes Charakteristikum eine sehr deutliche Bande in der Region von  $3,3 \mu$  auf, die der CH-Schwingung einer tertiär-sekundären Epoxygruppe zuzuordnen ist<sup>10)</sup>. Ausserdem finden sich bei  $2,78 \mu$  ein sehr ausgeprägtes Maximum, und eine schwächere und breitere Bande bei  $2,87 \mu$ , weshalb Acetylcinobufotalin noch eine freie HO-Gruppe besitzen muss. Da Acetyl-

<sup>1)</sup> Auszug aus der Dissertation F. BERNOULLI, Basel 1961.

<sup>2)</sup> 27. Mitteilung: M. BHARUCHA, K. K. CHEN, Ek. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **44**, 844 (1961).

<sup>3)</sup> J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1270 (1957).

<sup>4)</sup> M. KOTAKE & K. KUWADA, *Scient. Pap. Inst. physic. chem. Research (Tokio)* **32**, 1 (1937); *Chem. Zbl.* **1937**, II, 1588.

<sup>5)</sup> Den früheren Bearbeitern war entgangen, dass das von ihnen jeweils aus *Ch'an Su* erhaltene und als Cinobufagin bezeichnete Kristallisat ein Gemisch darstellt, das zu etwa einem Drittel aus Cinobufotalin bestand. Vergl. hierzu MEYER<sup>6)</sup>.

<sup>6)</sup> K. MEYER, *Pharmac. Acta Helv.* **24**, 222 (1949).

<sup>7)</sup> M. KOTAKE & K. KUWADA, *Scient. Pap. Inst. physic. chem. Research (Tokio)* **32**, 79 (1937).

<sup>8)</sup> M. KOTAKE & K. KUWADA, *Scient. Pap. Inst. physic. chem. Research (Tokio)* **39**, 361 (1942).

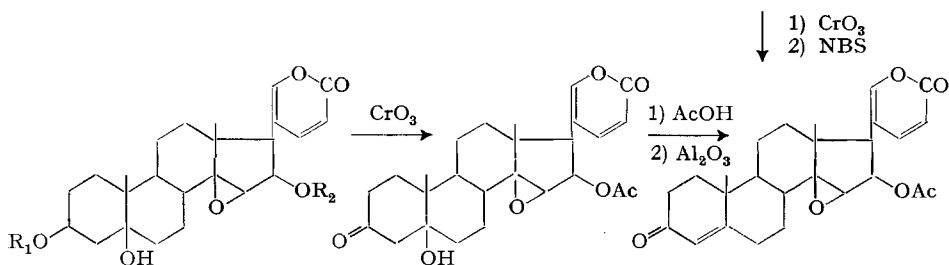
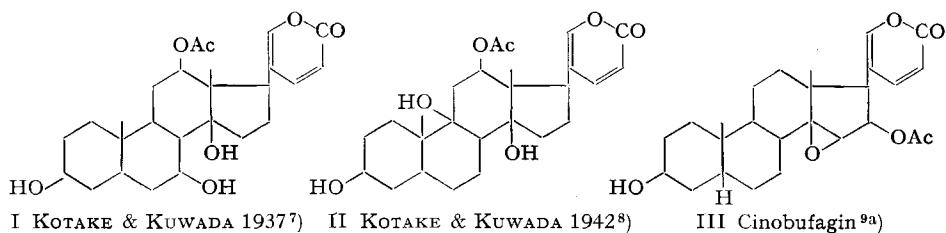
<sup>9)</sup> M. KOMATSU, *Annu. Rep. ITSUU Lab.*, Heft **9**, 95 (1958), gibt für Cinobufotalin eine andere Formulierung (11-ständiges statt 9-ständiges Hydroxyl). Dies ist offensichtlich ein Druckfehler, denn Herr Dr. KOMATSU hat uns wissen lassen, dass er die in seiner Arbeit angegebene Formulierung des Cinobufotalins von KOTAKE & Kuwada<sup>8)</sup> übernommen habe.

<sup>9a)</sup> P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **43**, 1955 (1960).

<sup>10)</sup> Vgl. hierzu H. SCHRÖTER, Ch. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **41**, 720 (1958).

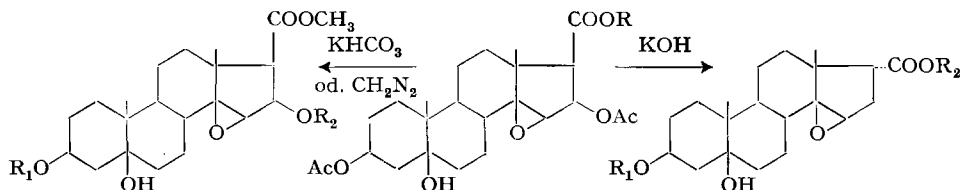
cinobufotalin durch  $\text{CrO}_3$  in Eisessig nicht verändert wird, muss diese spektroskopisch nachgewiesene HO-Gruppe tertiärer Natur sein. Diese Befunde liessen vermuten, dass es sich beim Cinobufotalin um ein Hydroxycinobufagin entsprechend der Formel V handeln könnte. Diese Vermutung liess sich – wie im folgenden ausgeführt wird – eindeutig beweisen.

Cinobufotalin (V) gibt bei vorsichtiger Dehydrierung mit  $\text{CrO}_3$  (in Wasser-Aceton-Schwefelsäure<sup>11)</sup>) ein Keton (VII) vom Smp. 252–253°, dessen Analysenwerte auf die Formel  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_7$  passten. Dieses Keton, das mit dem von KOTAKE & KUWADA<sup>4)</sup>



V ( $\text{R}_1 = \text{H}$ ;  $\text{R}_2 = \text{Ac}$ ) Cinobufotalin  
F. 254–258°\* [+11]<sup>6)</sup>

VI ( $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Ac}$ ) F. 221–222°\*  
[+24]<sup>6)</sup> [+10 Me]<sup>3)</sup>



X ( $\text{R}_1 = \text{Ac}$ ;  $\text{R}_2 = \text{H}$ )  
F. 195–198° [+18]\*)

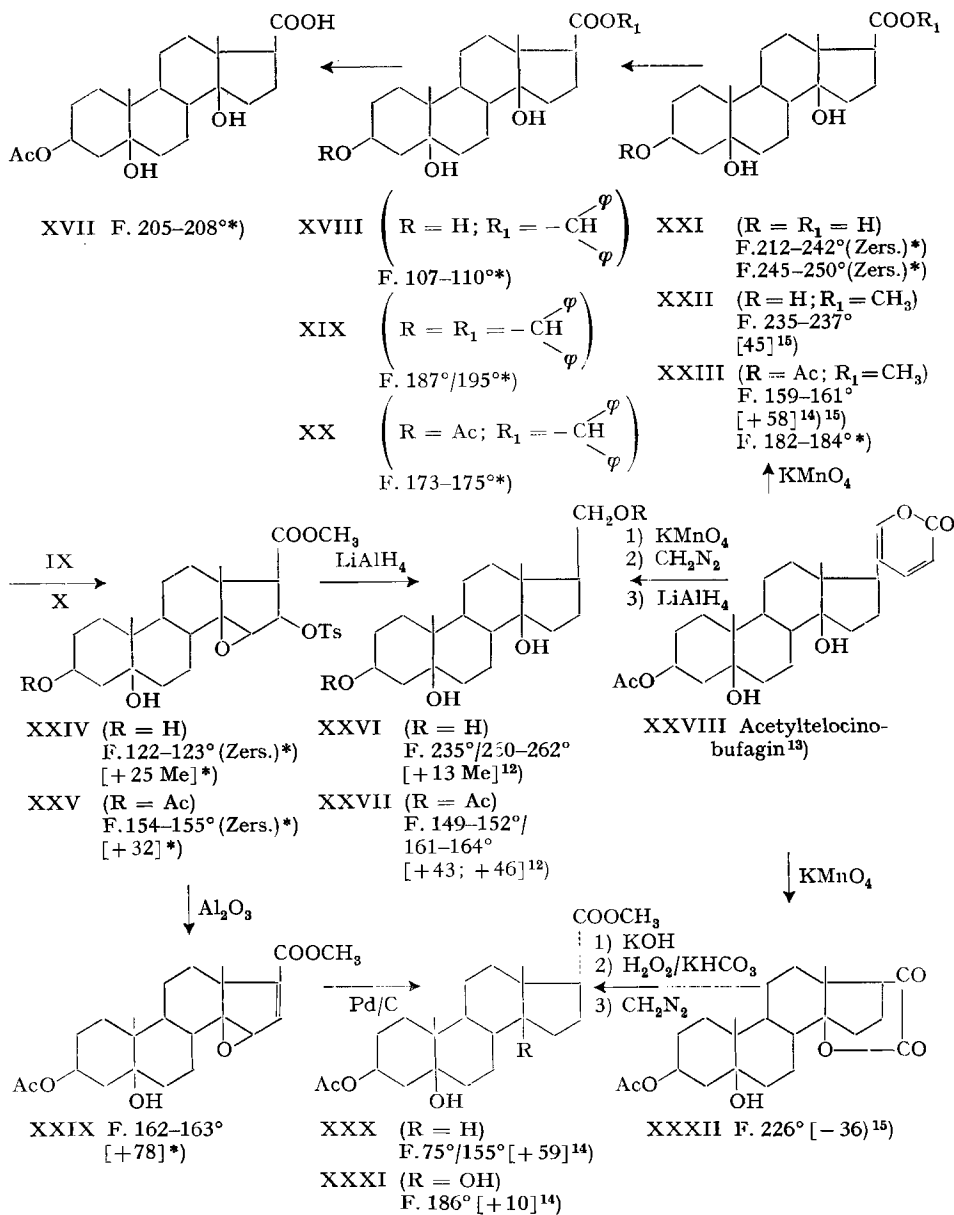
XIII ( $\text{R} = \text{CH}_3$ )  
F. 175–178°/  
185–186° [+36]\*)

XV ( $\text{R}_1 = \text{H}$ ;  $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ )  
F. 219–228°/  
232–234° [+53]\*)

XI ( $\text{R}_1 = \text{H}$ ;  $\text{R}_2 = \text{Ac}$ )  
F. 220–223° [+27]

XVI ( $\text{R}_1 = \text{Ac}$ ;  $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ )  
F. 199–201° [+87]\*)

<sup>11)</sup> K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* 1946, 39; R. G. CURTIS, SIR. I. HEILBRON, E. R. H. JONES & G. F. WOODS, *ibid.* 1953, 457; vgl. auch H. HEUSSER, M. ROTH, O. ROHR & R. ANLIKER, *Helv.* 38, 1178 (1955).



\*) Siehe Exper. Teil dieser Arbeit. Ac = CH<sub>3</sub>CO–; Ts = *p*-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>–; NBS = N-Bromsuccinimid; die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Zahlen auf- oder abgerundete spezifische Drehung für Na-Licht an, wobei keine Bezeichnung Drehung in Chloroform und Me Drehung in Methanol bedeutet.

<sup>12)</sup> H. SCHRÖTER, R. REES & K. MEYER, *Helv.* 42, 1385 (1959).

<sup>13)</sup> K. MEYER, *Helv.* 32, 1593 (1949).

<sup>14)</sup> P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 30, 2143 (1947).

<sup>15)</sup> P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 31, 622 (1948); vgl. auch (physikalische Daten) bei <sup>13)</sup>.

beschriebenen Cinobufotalon vom Smp. 246–248° identisch sein dürfte, gibt nach Erhitzen in Eisessig und Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  unter Wasserabspaltung ein  $\alpha, \beta$ -ungesättigtes Keton  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_6$ , welches ebenfalls vor mehreren Jahren<sup>6)</sup> schon erhalten, aber nicht als solches erkannt worden war. Der Konstitutionsbeweis für dieses Anhydroketon konnte nun durch Verknüpfung mit Cinobufagin (III) wie folgt erbracht werden: Cinobufagin wurde zum Cinobufagon dehydriert und dieses mit Bromsuccinimid unter Belichtung umgesetzt. Das dabei erhaltene rohe Reaktionsprodukt gab nach Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ein Gemisch, das nach Papierchromatographie zur Hauptsache aus Cinobufagon bestand, aber auch das gesuchte  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Keton (Anhydrocinobufotalon  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_6$ ) enthielt. Letzteres konnte erst mit Hilfe der präparativen Verteilungschromatographie auf Papier rein erhalten werden. Diesem aus Cinobufagon bereiteten Anhydroketon muss auf Grund seiner Bildungsweise aus Cinobufagin die Konstitution VIII zukommen. Es erwies sich nach Smp., Mischprobe und IR.-Spektrum als identisch mit dem aus Cinobufotalon erhaltenen Anhydroketon. Damit war die Konstitution des Cinobufotalins grösstenteils entsprechend dem eingangs gegebenen Formelvorschlag V gesichert. Es verblieb nur noch die Abklärung der räumlichen Lage der HO-Gruppen an C-3 und C-5, deren Haftstellen sich schon aus der Konstitution des Anhydroketons VIII und seiner Bildungsweise aus V ableiten lassen. Zur Klärung dieser verbleibenden Teilfrage haben wir den Weg über den oxydativen Abbau zur Ätiansäurestufe gewählt, weil die Kenntnis der dabei erhältlichen Abbauprodukte im Zusammenhang mit der Klärung konstitutioneller Fragen bei analog gebauten Naturstoffen der Steroidreihe nützlich ist.

Acetylcinobufotalin (VI) wurde mit  $\text{KMnO}_4$  in Aceton oxydiert und gab dabei neben beträchtlichen Mengen amorpher neutraler Anteile die kristallisierte Säure XII vom Smp. 215–217° (Zers.), deren Methyl ester XIII den Doppel-Smp. 175–178°/185–186° zeigte und Analysenwerte gab, die gut auf die Formel  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_8$  passten. Der Ester XIII wird durch KOH in wässrigem Methanol nicht nur verseift, sondern grösstenteils auch strukturell verändert, denn nach Methylierung und Acetylierung des Verseifungsproduktes wurde der Ester XIII nicht mehr zurückgebildet. In Analogie zum Verhalten der Abbauester aus Acetylresibufogenin<sup>16)</sup>, Acetylmarinobufagin<sup>17)</sup> und Acetylcinobufagin<sup>18)</sup> gegenüber starkem Alkali dürfte auch hier neben der Verseifung eine Epimerisierung an C-17 eingetreten sein, was bei den genannten Abbauestern eindeutig bewiesen werden konnte<sup>9a)12)19)</sup>.

Durch längeres Stehenlassen mit  $\text{KHCO}_3$  in wässrigem Methanol oder mit ätherischer Diazomethanolösung<sup>20)</sup> wird beim Ester XIII nicht nur die 16-ständige Acetoxygruppe, sondern auch diejenige an C-3 verseift bzw. umgeestert, wobei ausschliesslich die Trihydroxyverbindung IX entsteht. Dieser Befund spricht dafür, dass die Hydroxylgruppe an C-5 zu der Acetoxygruppe an C-3 *cis*-orientiert ist, wodurch bekanntlich die Verseifung dieser Estergruppe ausserordentlich erleichtert

<sup>16)</sup> K. MEYER, *Helv.* 35, 2444 (1952).

<sup>17)</sup> St. PATAKI & K. MEYER, *Helv.* 38, 1631 (1955).

<sup>18)</sup> J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* 41, 2121 (1958).

<sup>19)</sup> H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* 42, 807 (1959).

<sup>20)</sup> Vgl. hierzu M. ZINGG & K. MEYER, *Helv.* 43, 145 (1960), und ganz besonders H. BREDERECK, R. SIEBER & L. KAMPHENKEL, *Chem. Ber.* 89, 1169, 1173 (1956).

wird<sup>21)</sup>. Die Einwirkung von  $\text{KHCO}_3$  auf die Estersäure XII führt demgegenüber zu einer ganzen Reihe von Produkten. In einem Modellversuch, bei dem reines, kristallisiertes XII verwendet wurde, konnten die einzelnen Bestandteile des Verseifungsproduktes (nach Veresterung mit Diazomethan) durch Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  isoliert und identifiziert werden. Es liessen sich dabei (in der Reihenfolge ihrer Eluierbarkeit) die Ester XIII (aus unverändertem XII; ca. 30%), XI (Verseifung an C-3; ca. 30%), X (Verseifung an C-16; ca. 15%) und IX (Verseifung an C-3 und C-16; ca. 10%) in Kristallen gewinnen, während das fünfte Produkt, vermutlich der ungesättigte Ester XXIX, der geringen Mengen wegen nur mit Hilfe des Dünnschichtchromatogramms in den Mutterlaugen des Esters XI nachgewiesen werden konnte. Bei präparativen Verseifungsansätzen wurde jeweils die rohe Abbausäure aus VI, die nur zu etwa der Hälfte aus XII besteht, eingesetzt. Die chromatographische Aufteilung des methylierten rohen Verseifungsproduktes gab dann neben dem Ester XIII in erster Linie den 16-Hydroxyester X und wenig Ester IX. Der 3-Hydroxyester XI wurde nicht erhalten.

Das ungleiche Verhalten des Esters XIII und seiner freien Säure XII gegenüber  $\text{KHCO}_3$  scheint in erster Linie dadurch bedingt zu sein, dass die Säure XII in  $\text{KHCO}_3$ -Lösung weitgehend in Form des Carboxylat-Anions vorliegt, wodurch die Acetoxygruppen vor einem nucleophilen Angriff elektrostatisch abgeschirmt werden. Möglicherweise ist bei der Bildung des Esters X auch ein «Anhydridmechanismus»<sup>22)</sup> an der Verseifung der 16-ständigen Acetoxygruppe mitbeteiligt. In Modellversuchen mit  $\beta$ -Acetoxy-5,14-dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure (XVII) bzw. deren Methylester (XXIII) liess sich wenigstens dieser durch das Ätiansäure-Anion verursachte elektrostatische Effekt deutlich machen: während beim Ester durch  $\text{KHCO}_3$  glatt und quantitativ Verseifung der 3-Acetoxygruppe eintritt, wird bei der freien Säure unter den gewählten Reaktionsbedingungen höchstens 1/3 der eingesetzten Substanz in die 3-Hydroxy-Verbindung übergeführt.

Die für den zuletzt beschriebenen Modellversuch benötigte  $\beta$ -Acetoxy-5,14-dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure (XVII) ist sowohl aus Acetylperiplogenin<sup>14)15)</sup> wie aus Acetyltelocinobufagin (XXVIII)<sup>13)</sup> relativ leicht herstellbar. Bisher konnte sie aber nicht in Kristallen gewonnen werden. Ausgehend von XXVIII haben wir uns eine grössere Menge der rohen Abbausäure XVII bereitet. Da daraus wiederum keine Kristalle erhalten werden konnten, haben wir die reine Säure auf folgendem Umweg gewonnen: der Ester XXIII wurde mit KOH zur Säure XXI verseift und diese mit Diphenyldiazomethan in den Benzhydrylester XVIII übergeführt. Etwa in gleicher Ausbeute wurde neben XVIII ein weniger polarer Ester erhalten, der aber bei der Behandlung mit Pyridin-Acetanhydrid unverändert blieb. Da er bei der Hydrierung

<sup>21)</sup> H. B. HENBEST & B. J. LOVELL, *Chemistry & Ind.* 1956, 278; *J. chem. Soc.* 1957, 1965; S. M. KUPCHAN & W. S. JOHNSON, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 3864 (1956); S. M. KUPCHAN, W. S. JOHNSON & S. RAJAGOPALAN, *Tetrahedron* 7, 47 (1959); S. M. KUPCHAN & C. R. NARAYANAN, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 1913 (1959); S. M. KUPCHAN, P. SLADE & R. J. YOUNG, *Tetrahedron Letters* Nr. 24, 22 (1960). Der von HENBEST *et al.* vorgeschlagene Mechanismus der alkalischen Hydrolyse von 1,3-Diol-monoestern ist inzwischen berichtigt worden; TH. C. BRUCE & TH. H. FIFE, *Tetrahedron Letters* Nr. 8, 263 (1961).

<sup>22)</sup> E. GAETJENS & H. MORAWETZ, *J. Amer. chem. Soc.* 83, 1738 (1961); vgl. hierzu auch M. L. BENDER & M. C. NEVEU, *ibid.* 80, 5388 (1958); T. C. BRUCE & U. K. PANDIT, *ibid.* 82, 5858 (1960).

mit Pd-Kohle in Alkohol in die Säure XXI übergang, muss es sich bei diesem Nebenprodukt um den Benzhydryläther XIX handeln. Acetylierung von XVIII gab den 3-Acetoxyester XX, aus dem sich durch Hydrierung mit Pd-Kohle die Acetoxyssäure XVII in Kristallen vom Smp. 205–208° gewinnen liess.

Dass dem oben erwähnten, durch partielle Verseifung mit  $\text{KHCO}_3$  erhaltenen Ester X die Konstitution eines  $3\beta$ -Acetoxy- $16\beta$ -hydroxy-esters zukommt – der Ester XI ist dann eine  $3\beta$ -Hydroxy- $16\beta$ -acetoxy-Verbindung – ergibt sich aus den nachfolgend geschilderten Umsetzungen.

Stehenlassen von X mit Tosylchlorid in Pyridin bei 20° gab in mässiger Ausbeute das 16-Tosylat XXV. Die Ausbeuten an XXV hätten vermutlich gesteigert werden können, wenn X bei höherer Temperatur tosyliert worden wäre. Bessere Ausbeuten an XXV wurden durch Tosylierung des Esters IX bei 30° und Acetylierung des dabei erhaltenen 16-Tosylates XXIV erzielt<sup>23)</sup>.

Durch Kontakt mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ging der Ester XXV unter Abspaltung der Tosyloxygruppe in den ungesättigten Ester XXIX über, der bei der Hydrierung mit Pd-Kohle ein Gemisch gab, aus dem  $3\beta$ -Acetoxy-5-hydroxy- $5\beta,14\beta,17\beta\text{H}$ -ätiansäure-methylester (XXX)<sup>14)</sup> und  $3\beta$ -Acetoxy-5,14-dihydroxy- $5\beta,14\beta,17\beta\text{H}$ -ätiansäure-methylester (XXXI)<sup>14)</sup> isoliert werden konnten. Der Ester XXV liess sich ausserdem noch auf dem folgenden Wege mit einem bekannten und bezüglich der Asymmetriezentren C-3 und C-5 abgeklärten Steroid verknüpfen: durch  $\text{LiAlH}_4$ -Reduktion wurde u.a. das Tetrol XXVI gebildet. Dieses und seine Acetylverbindung XXVII waren mit den entsprechenden Abbauprodukten aus Telocinobufagin bzw. Marinobufagin<sup>12)</sup> identisch. Damit sind auch die beiden Hydroxyle an C-3 und C-5 des Cinobufotalins bezüglich ihrer räumlichen Lage eindeutig entsprechend der Formulierung V abgeklärt.

Der CIBA AG., Basel, danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

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

Abkürzungen: Ac =  $\text{CH}_3\text{CO}$ -, AcOH = Eisessig, (Ac)<sub>2</sub>O = Acetanhydrid, Ä = Diäthyläther, Al = 95-proz. Äthanol, An = Aceton, Bz = Benzol, Chf = Chloroform, Ee = Essigester, Me = Methanol, ML = Mutterlaugenrückstände, Pe = Petroläther, Pn = Pentan, Py = Pyridin, W = Wasser.

### Cinobufotalon (VII) und Anhydrocinobufotalon (VIII)

*Cinobufotalon (VII)*. 300 mg Cinobufotalin (V) vom Smp. 254–258° (mehrmals aus An umkristallisiert) wurden in 25 ml An gelöst, auf 0° abgekühlt und langsam mit 0,3 ml KILIANI-Mischung ( $\text{CrO}_3$  266,7 g, 230 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ad 1000 ml W) versetzt. Nach 10 Min. wurden 20 ml W und 500 mg krist. Na-Acetat zugegeben, im Vakuum bei möglichst niedriger Temperatur vom An befreit und hierauf mit Chf erschöpfend extrahiert. Dieses hinterliess nach Waschen mit W, Trocknen über Na-Sulfat und Eindampfen im Vakuum rund 300 mg öligen Rückstand, der aus Me (bei -70°) kristallisierte. Nach Zugabe von Ä 230 mg Kristalle von VII, Smp. 251–252°, die nach zweimaligem Umlösen (erst aus An-Ä, dann aus Me-Ä) bei 253–253,5° schmolzen;  $[\alpha]_D^{25} = +14,7^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,63$  in Chf). Die aus den ersten Eluaten einer über Silicagel chromat-

<sup>23)</sup> H. MUHR, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 403 (1954), haben demgegenüber beobachtet, dass Periplogenin bereits bei 23° z. T. in 3-Stellung tosyliert wird. Der diesem Butenolid entsprechende Ätiansäure-methylester XXII bleibt, wie wir fanden, bei der Einwirkung von Tosylchlorid in Pyridin bei 20° unverändert.

graphierten Probe von VII gewonnenen Kristalle wurden vereinigt und aus  $\ddot{A}$ -An umkristallisiert: Smp. 256–258°. Zur Analyse wurde 4 Std. bei 60° im Hochvakuum über  $P_2O_5$  getrocknet.

$C_{26}H_{32}O_7$  (456,51) Ber. C 68,40 H 7,06 O 24,53% Gef. C 68,18 H 7,01 O 24,56%

*Anhydrocinobufotalon (VIII)*. – a) *Aus VII*. 50 mg VII vom Smp. 252–253,5° wurden in 0,5 ml Eisessig gelöst und in einem Reagenzglas von 8 cm Länge und 8 mm lichter Weite 1 Std. erhitzt (Ölbadtemperatur 150°). Nach Aufnehmen in  $\ddot{A}$ -Chf-(4:1) wurde mit verd. Sodälösung und W gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde an  $Al_2O_3$  chromatographiert. Die mit Chf, Chf-Me (49:1), -(19:1) eluierte Substanz (15 mg) gab aus An- $\ddot{A}$  feine seidenglänzende Nadelchen vom Smp. 208–212°;  $[\alpha]_D^{20} = +48,7^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,03$  in Chf);  $\lambda_{max} = 236 m\mu$ ,  $\log \epsilon = 4,25$  (in Al.). Zur Analyse wurde 6 Std. bei 0,01 Torr und 100° getrocknet.

$C_{26}H_{30}O_6$  (438,50) Ber. C 71,21 H 6,89 O 21,89% Gef. C 71,04 H 7,17 O 22,02%

b) *Aus Cinobufagin (III)*. 2,29 g Cinobufagin (III) vom Smp. 211–214° wurden in 40 ml AcOH gelöst, im Lauf von 2 Std. mit 25 ml 2-proz.  $CrO_3$ -AcOH-Lösung versetzt und anschliessend 14 Std. bei 20° stehengelassen. Nach Zugabe von einigen ml Me wurde nach 3 Std. im Vakuum grösstenteils vom AcOH befreit, in Chloroform aufgenommen, dieses neutral gewaschen und wie üblich aufgearbeitet. Der neutrale Rückstand wurde in An aufgenommen, und nachdem Kristallisation einsetzte,  $\ddot{A}$ -Pe zugegeben. Es wurden 1,77 g Cinobufagon vom Smp. 232–239° erhalten. Diese wurden in 110 ml  $CCl_4$  gelöst, mit 3,65 g N-Bromsuccinimid (NBS) versetzt und in einem Kolben über einer UV.-Lampe, die durch Wasserbadringe so abgedeckt war, dass die Öffnung des kleinsten Ringes ungefähr der Grösse des Flüssigkeitsspiegels im Kolben entsprach, 90 Minuten unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde vom NBS abfiltriert, die Lösung eingedampft und in 30 ml trockenem Py 90 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Verjagen des Py im Vakuum, Neutralwaschen des Rückstandes in  $\ddot{A}$ -Chf-(4:1), wurde in Bz-Chf-(3:2) gelöst und durch eine Säule von 35 g  $Al_2O_3$  filtriert. Das Filtrat gab nach Verdunsten des Lösungsmittels und Aufnehmen in An- $\ddot{A}$  590 mg Kristalle vom Smp. 234–240°, die nach Papierchromatogramm [System Formamid/Pe-Bz-(3:2)] neben Anhydrocinobufotalon (VIII) grösstenteils aus Ausgangsmaterial VII bestanden. Da die ML der Kristalle vom Smp. 234–240° keine selektive Absorption im UV. (Bufadienolid) aufwiesen, wurden die Kristalle allein an 20 g  $Al_2O_3$  chromatographiert. Die Fraktionen mit Pe-Bz-(1:4) bis Bz eluierten ein Gemisch (total 167 mg) von VII und VIII, das nach Papierchromatographie (System siehe oben) etwa 20% VIII enthielt. 110 mg dieses Gemisches wurden in Me gelöst und auf 16 Bogen WHATMAN-Papier Nr. 1 (18 cm  $\times$  64 cm), die mit Formamid imprägniert worden waren, gleichmässig auf der ganzen Länge der Startlinien aufgetragen. Die Bogen wurden hierauf im Schlitztrog<sup>24)</sup> mit Pe-Bz-(3:2) bis zum Abtropfen der mobilen Phase entwickelt. Nach dem Trocknen ( $\frac{1}{2}$  Std.) an der Luft wurden die im UV. sichtbaren Zonen markiert und herausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Papierstreifen wurden zerkleinert, mit W geweicht, mit der gleichen Menge Me versetzt und im Wasserbad bei 50° 1 Std. mazeriert. Nach Abnutschen wurde diese Extraktion wiederholt und hierauf in analoger Weise noch je zweimal mit Me-W-(2:1) und reinem Me durchgeführt. Die vereinigten Auszüge wurden im Vakuum vom Me befreit und die verbliebene wässrige Lösung mit Chf extrahiert. Nach Verjagen des Chf im Vakuum wurde der Rückstand in Bz aufgenommen und an 15 g  $Al_2O_3$  wie unter a) beschrieben chromatographiert. Es konnten 20 mg VIII vom Smp. 199–208° erhalten werden, die nach einmaligem Umlösen bei 201–208° schmolzen. Mischprobe mit dem oben beschriebenen Anhydrocinobufotalon (VIII) Smp. 199–209°;  $[\alpha]_D^{20} = +40,4^\circ \pm 5^\circ$  ( $c = 0,443$  in Chf);  $\lambda_{max} = 235 m\mu$ ,  $\log \epsilon = 4,2$  (in Al.). Das IR.-Spektrum war identisch mit dem des aus Cinobufotalin erhaltenen Anhydrocinobufotalons (VIII).

#### KMnO<sub>4</sub>-Abbau des Acetylcinobufotalins (VI)

*Acetylcinobufotalin (VI)*. Eine durch Chromatographie an  $Al_2O_3$  gereinigte, mehrmals aus An umkristallisierte Probe von Cinobufotalin vom Smp. 254–258° wurde in Py-(Ac)<sub>2</sub>O acetyliert. Aus der rohen Acetylverbindung VI konnten durch mehrmaliges Umlösen aus An- $\ddot{A}$  Kristalle

<sup>24)</sup> E. VON ARX & R. NEHER, Helv. 39, 1664 (1956).

(Nadelchen) vom Smp. 221–222° erhalten werden. Zur Analyse wurde 24 Std. bei 110° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_{28}H_{36}O_8$  (500,57) Ber. C 67,18 H 7,25% Gef. C 67,46 H 7,30%

*3β,16β-Diacetoxy-5-hydroxy-14,15β-epoxy-5β,14β,17αH-ätiansäure (XII) und Methylester XIII.* 4,0 g Acetylcinobufotalin (VI) vom Smp. 213–218° wurden in 200 ml An gelöst, auf 0° abgekühlt, allmählich (innert 30 Min.) unter ständigem Umschwenken mit 4,0 g fein gepulvertem  $KMnO_4$  versetzt und hierauf 2 Std. bei 20° auf der Schüttelmaschine belassen. Nach dieser Zeit war nahezu alles  $KMnO_4$  verbraucht. Nun wurden noch 1,5 g gepulvertes  $KMnO_4$  (wie oben) zugegeben und noch weitere 3 Std. geschüttelt. Die noch sehr wenig  $KMnO_4$  enthaltende Suspension wurde im Vakuum stark eingeeengt, mit wenig W versetzt, weiter im Vakuum konzentriert unter allmählichem Austausch des An gegen W. Die wässrige  $MnO_2$ -Suspension wurde dann mit verd.  $H_2SO_4$  eben kongosauer gemacht und wiederholt mit Chf extrahiert. Eine Schichten-trennung liess sich in der Regel erst durch Zentrifugieren erzielen. Die dunkelbraun gefärbten Chf-Auszüge wurden jeweils einmal mit W gewaschen, vereinigt, im Vakuum auf kleines Volumen eingedampft mit viel Ä versetzt, von den ausgefallenen braunen Flocken durch Filtration getrennt und im Vakuum auf etwa 20–30 ml konzentriert. Nach dem Versetzen mit Ä-Chf-(4:1) wurde im Scheidetrichter mit verd.  $Na_2CO_3$ -Lösung in saure und neutrale Anteile aufgetrennt. Die sauren Anteile (2,3 g) gaben aus An-Ä klare, zu Drusen vereinigte Kristalle von XII, die bei 215–217° (Zers.) schmolzen. Kristalle und ML wurden vereinigt, mit ätherischem Diazomethan verestert und in trockenem Py mit  $(Ac)_2O$  nachacetyliert (15 Std. bei 35°). Der nach üblicher Aufarbeitung erhaltene rohe Ester wurde an  $Al_2O_3$  chromatographiert. Bz, Bz-Chf-(19:1), -(9:1) und -(4:1) eluierten 1,17 g. Aus An-Ä 850 mg Nadelchen (XIII) vom Doppel-Smp. 175–178°/185–186°;  $[\alpha]_D^{19} = +35,7^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,40$  in Chf). Zur Analyse wurde 3 Std. bei 100° über  $P_2O_5$  bei 0,01 Torr getrocknet.

$C_{25}H_{36}O_8$  (464,54) Ber. C 64,64 H 7,81% Gef. C 64,89 H 7,98%

*3β,5,16β-Trihydroxy-14,15β-epoxy-5β,14β,17βH-ätiansäure (XIV) (?).* 480 mg Diacetoxy-ester XIII vom Smp. 174–177°/185–186° wurden in 20 ml Me gelöst, mit 2 ml 25-proz. KOH versetzt und 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Versetzen mit verd. HCl (bis zur eben kongosauen Reaktion) wurde im Vakuum vom Me befreit und die verbliebene wässrige Suspension 3mal mit Chf ausgeschüttelt, wobei sich 89 mg Substanz extrahieren liessen. Dieses Material wurde nicht weiter untersucht. Das in W und Chf Unlösliche wurde durch Absaugen isoliert, gründlich mit W und Chf gewaschen und im Exsiccator getrocknet: 291 mg. Aus Me-Ä zu Rosetten vereinigte 3seitige Platten vom Smp. 230–235° (Zers.).

*3β,5,16β-Trihydroxy-14,15β-epoxy-5β,14β,17βH-ätiansäure-methylester (XV) (?).* 250 mg Säure XIV wurden mit einigen Tropfen Me bedeckt und mit überschüssigem ätherischem Diazomethan versetzt. Nach beendeter Reaktion wurde im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand gab aus An-Ä Rhomben vom Doppel-Smp. 219–228°/232–234°;  $[\alpha]_D^{21} = +53,3^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,780$  in Chf).

*3β,16β-Diacetoxy-5-hydroxy-14,15β-epoxy-5β,14β,17βH-ätiansäure-methylester (XVI) (?).* Nach Acetylierung des Esters XV in  $(Ac)_2O$ -Py wurden aus Ä-Pe feine Prismen vom Smp. 199–201° und  $[\alpha]_D^{20} = +87,3^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,683$  in Chf)<sup>25)</sup> erhalten. Zur Analyse wurde 3 Std. bei 100° und 0,02 Torr getrocknet.

$C_{25}H_{36}O_8$  (464,54) Ber. C 64,64 H 7,81 O 27,56% Gef. C 64,84 H 7,84 O 27,17%

### Verseifungsversuche mit $KHCO_3$

1. Mit *3β,16β-Diacetoxy-5-hydroxy-14,15β-epoxy-5β,14β,17αH-ätiansäure (XII)*. – *3β,16β-Diacetoxy-5-hydroxy-14,15β-epoxy-5β,14β,17αH-ätiansäure-methylester (XIII)*, *3β,5-Dihydroxy-16β-acetoxy-14,15β-epoxy-5β,14β,17αH-ätiansäure-methylester (XI)*, *3β-Acetoxy-5,16β-dihydroxy-14,15β-epoxy-5β,14β,17αH-ätiansäure-methylester (X)*, *3β-Acetoxy-5-hydroxy-14,15β-epoxy-ätiansäure-methylester (XXIX) (?)* und *3β,5,16β-Trihydroxy-14,15β-epoxy-5β,14β,17αH-ätiansäure-methylester (IX)*.

<sup>25)</sup> Für die auf analoge Weise aus den Abbauestern von Acetylresibufogenin, Acetylmari-nobufagin und Acetylcinobufagin erhaltenen an C-17 epimeren Ester wurde ebenfalls eine um 10–30° höhere Drehung als bei den entsprechenden 17αH-Estern gefunden<sup>9 a) 28) 19)</sup>.



a) *Modellversuch*. 225 mg XII vom Smp. 214–215° (Zers.) wurden in 10 ml Me gelöst, mit 300 mg  $\text{KHCO}_3$  in 4 ml W versetzt und die klare Lösung 110 Std. bei 20° stehengelassen. Nach dem Neutralisieren mit 1N HCl (3,0 ml) wurde im Vakuum vom Me befreit, die verbliebene wässrige Lösung mit Chf extrahiert und dieses nach dem Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in wenig Me gelöst und mit ätherischem Diazomethan verestert. Im Dünnschichtchromatogramm [Kieselgur G, Ee-Pe-(7:3), Sichtbarmachen der Flecke durch Besprühen mit  $\text{SbCl}_5$ -Chf-(1:4) und Erhitzen auf etwa 100°] 4 Flecke, die sich in den Rf-Werten stark voneinander unterschieden und in der Reihenfolge zunehmender Polarität den Estern XIII, X, XI und IX entsprachen. – Die chromatographische Auftrennung an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gab das folgende Resultat: Bz, Bz-Chf(19:1), -(9:1), -(4:1) und -(3:2) eluierten 60 mg rohen Ester XIII: aus An-Ä-Kristalle vom Smp. 174–175°/184–185°. Bz-Chf-(3:7) gab 19 mg Eindampfrückstand. Aus An-Ä etwa 10 mg Kristalle von XI vom Doppel-Smp. 105–110°/195–210°; nach dem Umlösen aus An-Ä Smp. 220–223°. Im Dünnschichtchromatogramm (siehe oben) nur 1 Fleck.-Chf eluierte 82 mg Substanz. Aus An-Ä kurze, kleine an der Wand haftende Prismen und auf diesen lange, spiessige in die Lösung ragende Prismen. Nach Abgiessen der Mutterlauge [gibt im Dünnschichtchromatogramm (siehe oben) 4 Flecke, deren Rf-Werte den Estern – Reihenfolge entsprechend zunehmender Polarität – XXIX, XIII, X und XI entsprachen] wurden beide Kristallformen durch Auslesen getrennt. Die langen Prismen wurden aus An-Ä umkristallisiert: Smp. 215–222°;  $[\alpha]_D^{25} = +27,2^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,11$  in Chf): Ester XI. Im Dünnschichtchromatogramm (siehe oben) gaben die Kristalle nur 1 Fleck. [Acetylierung einer kleinen Probe gab den Ester XIII.] Die kleinen Prismen schmolzen nach dem Umlösen aus An-Ä bei 195–198°;  $[\alpha]_D^{25} = +17,6^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,71$  in Chf): Ester X. Im Dünnschichtchromatogramm (siehe oben) nur 1 Fleck. [Acetylierung einer kleinen Probe gab den Ester XIII.] – Chf-Me-(99:1) eluierte 17 mg Ester IX vom Smp. 184–187° (siehe unter 2).

b) *Präparativer Versuch*. 5,2 g Acetylcinobufotalin (VI) vom Smp. 220–222° wurden (wie oben beschrieben) mit  $\text{KMnO}_4$  in An abgebaut. Es wurden 3,3 g saure Anteile und 1,8 g neutrale Anteile erhalten. Die neutralen Anteile gaben nach erneuter  $\text{KMnO}_4$ -Oxydation 1,15 g Säuren. Die vereinigten rohen Säuren (4,45 g) wurden in 200 ml Me gelöst, mit 4,5 g  $\text{KHCO}_3$  in 40 ml W versetzt und 220 Std. bei 20° stehengelassen. Nach dem Neutralisieren mit 1N HCl wurde im Vakuum vom Me befreit, die verbliebene wässrige Lösung mit Chf extrahiert und dieses nach dem Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in wenig Me gelöst, mit überschüssigem ätherischem Diazomethan methyliert und hierauf an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Pe-Bz-(1:3) und Bz eluierten 370 mg Substanz. Daraus konnten 320 mg kristallisierter Diacetoxyester XIII vom Doppel-Smp. 170–176°/181–182° gewonnen werden. Die Fraktionen mit Bz-Chf-(19:1) stellten Gemische der beiden Ester XIII und X dar. Bz-Chf-(9:1), -(4:1), -(2:3), -(7:3), Chf und Chf-Me-(99:1) eluierten 1,8 g Substanz. Aus An-Ä 500 mg Kristalle des Esters X vom Smp. 195–197° (die Mischprobe mit dem Ester IX vom Smp. 186–188° schmolz bei 156–184°);  $[\alpha]_D^{20} = +17,6^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,71$  in Chf). Die ML des Esters X (1,3 g) wurden erneut an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert und gaben dabei 400 mg rohen Ester X, rund 500 mg Gemisch der Ester X und IX und 300 mg rohen Ester IX. Der Ester XI wurde bei diesem Versuch nicht aufgefunden.

2. Mit 3 $\beta$ ,16 $\beta$ -Diacetoxy-5-hydroxy-14,15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiensäure-methylester (XIII). – 3 $\beta$ ,5,16 $\beta$ -Trihydroxy-14,15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiensäure-methylester (IX). 232 mg Ester XIII vom Doppel-Smp. 172–176°/184–186° wurden in 10 ml Me gelöst, mit 250 mg  $\text{KHCO}_3$  in 4 ml W versetzt und 110 Std. bei 20° stehengelassen. Nach dem Zufügen von 2,5 ml 1N HCl wurde im Vakuum vom Me befreit und wie üblich aufgearbeitet (Extraktion mit Chf usw.). Das rohe Verseifungsprodukt (= IX) wog 210 mg und gab aus An-Ä 150 mg zu Drusen vereinigte Prismen vom Smp. 186–188°.

3. Mit 3 $\beta$ -Acetoxy-5,14-dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiensäure (XVII). – 3 $\beta$ -Acetoxy-5,14-dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiensäure-methylester (XXIII) und 3 $\beta$ ,5,14-Trihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiensäure-methylester (XXII). 90 mg Acetoxyäure XVII vom Smp. 205–208° wurden in 4 ml Me gelöst, mit 120 mg  $\text{KHCO}_3$  in 1,6 ml W versetzt und 100 Std. bei 20° stehengelassen. Nach Neutralisation mit 1N HCl (1,2 ml) wurde im Vakuum vom Me befreit und die verbliebene wässrige Lösung erschöpfend mit Chf extrahiert. Dieses gab nach Waschen mit W, Trocknen über Na-Sulfat, Filtrieren und Eindampfen im Vakuum 75 mg Rückstand, der nach Veresterung mit

ätherischem Diazomethan an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert wurde. Bz-Chf-Gemische mit steigendem Gehalt an Chf und reines Chf eluierten rund 2/3 des eingesetzten Materials: aus An-Ä 38 mg Kristalle des Esters XXIII vom Smp. 182–184°<sup>26)</sup> und 11 mg kristallisierte ML. Mit Chf-Me-(99:1), -(49:1) und -(19:1) wurden 25 mg Substanz von der Säule gelöst: 17 mg Kristalle des Esters XXII vom Smp. 234–237° und 8 mg kristallisierte ML.

4. Mit *3 $\beta$ -Acetoxy-5,14-dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-methylester (XXIII)*. – *3 $\beta$ ,5,14-Trihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-methylester (XXII)*. 93 mg Methylester XXIII vom Smp. 182–184° wurden wie unter 3. beschrieben mit  $\text{KHCO}_3$  verseift und aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt wurde mit ätherischem Diazomethan methyliert. Es zeigte im Dünnschichtchromatogramm [Kieselgur G, System Ee-Pe-(7:3), mit Chf-SbCl<sub>3</sub>-(4:1) besprüht und auf 100° erhitzt] nur 1 Fleck. Aus An-Ä 75 mg Kristalle des Esters XXII vom Smp. 233–235° und 13 mg kristallisierte ML.

**3 $\beta$ , 5, 16-Trihydroxy-14, 15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ , 14 $\beta$ , 17 $\alpha$ H-ätiansäure-methylester (IX) aus XIII durch  $\text{CH}_2\text{N}_2$ .** – 300 mg Ester XIII vom Doppel-Smp. 172–176°/184–186° wurden in 3 ml Me gelöst, mit 3 ml ätherischem Diazomethan (entsprechend 300 mg Nitrosomethylharnstoff) versetzt und 27 Std. bei 2° stehengelassen. Das nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhaltene Produkt wurde an 9 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Die durch Elution mit Bz-Chf-(3:7), Chf und Chf-Me-(99:1) gewonnenen Anteile (total 245 mg) gaben aus An-Ä 160 mg zu Drusen vereinigte Prismen vom Smp. 186–188°, ohne Depression mit dem unter 2. beschriebenen Ester IX.  $[\alpha]_D^{25} = +1,7^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,50$  in Chf).

**Bereitung von kristallisierter 3 $\beta$ -Acetoxy-5, 14-dihydroxy-5 $\beta$ , 14 $\beta$ , 17 $\alpha$ H-ätiansäure (XVII).** – *3 $\beta$ ,5,14-Trihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure (XXI) und Methylester (XXII)*. 650 mg Ester XIII vom Smp. 182–184°<sup>26)</sup> (durch  $\text{KMnO}_4$ -Abbau von XXVIII<sup>13)</sup> gewonnen) wurden in 15 ml Me gelöst, mit 5 ml W und 2 ml 25-proz. KOH-Lösung versetzt und 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde im Vakuum vom Me befreit, mit verd. HCl kongosauer gemacht und die ausgefallene Säure abgenutscht. Diese gab aus Me körnige Prismen von XXI vom Smp. 203–233° (Zers.). Nach nochmaligem Umlösen aus Me, Smp. 212–242° (Zers.). Eine Probe davon wurde mit ätherischem Diazomethan verestert und aus An-Ä kristallisiert: Ester XXII in farblosen Rhomben, Smp. 235–237°<sup>15)</sup>.

*3 $\beta$ ,5,14-Trihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-benzhydrylester (XVIII) und 3 $\beta$ -Benzhydroyloxy-5,14-dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-benzhydrylester (XIX)*. 400 mg Säure XXI vom Smp. 212–242° (Zers.) wurden in 10 ml Dioxan gelöst, mit 800 mg frisch vorbereitetem Diphenyldiazomethan<sup>27)</sup> in 20 ml Isopropyläther 22 Std. unter Feuchtigkeitsausschluss rückfließend gekocht. Nach Verdampfen der Lösungsmittel im Vakuum wurde in Chf-Ä-(1:4) aufgenommen und mit verd. HCl, verd. Sodalösung und Wasser mehrmals gut durchgeschüttelt. Die organische Phase hinterliess nach dem Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Verdampfen im Vakuum 1,35 g öliges Material, das an 30 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert wurde. Die mit Pe-Bz und Bz eluierte Substanz (620 mg) wurde verworfen. Aus den Fraktionen mit Bz-Chf-(9:1), -(4:1) und -(3:2) wurden 270 mg Rückstand erhalten, der aus An-Ä 230 mg Kristalle mit undeutlichem Doppel-Smp. 187°/195° gab (= Ester XIX). [Eine Probe wurde in Py-(Ac)<sub>2</sub>O umgesetzt und blieb dabei unverändert. Eine weitere Probe wurde in Alkohol mit der 1,5-fachen Menge 10-proz. Pd-Kohle hydriert, vom Katalysator abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingedampft: aus Me-Ä-Kristalle vom Smp. 245–250° (Zers.) (= XXI). Methylierung mit Diazomethan gab den Ester XXII, Smp. 225–235° und Acetylierung des letzteren den Ester XXIII, Smp. 180–184°.] Die späteren Eluate mit Bz-Chf-(3:2) enthielten ein Gemisch der Ester XVIII und XIX. Mit Chf allein wurden 220 mg Substanz von der Säule abgelöst. Aus An-Ä 140 mg Kristalle vom Smp. 107–110° (= Ester XVIII). Die Fraktionen, die Gemische von XVIII und XIX enthielten, gaben nach erneuter Chromatographie noch weitere 90 mg des kristallisierten Esters XVIII vom Smp. 107–110°.

*3 $\beta$ -Acetoxy-5,14-dihydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-benzhydrylester (XX) und kristallisierte Acetoxysäure XVII*. 190 mg des Esters XVIII wurden in Py-(Ac)<sub>2</sub>O acetyliert. Die Acetyl-

<sup>26)</sup> Die früher<sup>13)</sup><sup>14)</sup><sup>15)</sup> beschriebene bei 159–161° schmelzende Modifikation des Esters XXIII konnte nicht mehr erhalten werden. Die Sammlungspräparate hatten sich in der Zwischenzeit verändert und zeigten den Doppel-Smp. 155–166°/180–182°.

<sup>27)</sup> Nach Organic Synthesis 24, 53 (1944).

verbindung XX gab aus An-Ä schuppige Plättchen vom Smp. 173–175°. 160 mg des Esters XX wurden in Al mit 240 mg 10-proz. Pd-Kohle hydriert. Es resultierten 120 mg rohe Acetoxy-säure XVII. Aus An-Ä 100 mg Kristalle vom Smp. 205–208°.

**Abbauprodukte aus 3 $\beta$ ,5,16-Trihydroxy-14,15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-methyl-ester (IX) und dessen 3-O-Acetyl-Derivat (X).**

3 $\beta$ ,5-Dihydroxy-16 $\beta$ -tosyloxy-14,15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-methylester (XXIV) und 3 $\beta$ -Acetoxy-5-hydroxy-16 $\beta$ -tosyloxy-14,15 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H-ätiansäure-methylester (XXV). a) – aus dem Ester IX. 354 mg Ester IX vom Smp. 181–186° wurden in 3,5 ml trockenem Py gelöst, mit einer Lösung von 245 mg *p*-Toluolsulfochlorid in 3,5 ml Py versetzt und 15 Std. bei 20° stehengelassen. Nach Zufügen von 1,75 ml W wurde noch weitere 2 Std. bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde die Lösung im Vakuum unter mehrmaligem Zufügen von wenig W auf ein kleines Volumen eingengt, mit verd. HCl kongosauer gemacht, mit Chf-Al-(9:1) extrahiert, dieses neutral gewaschen und in üblicher Weise aufgearbeitet. Das neutrale Rohprodukt gab aus An 401 mg farblose Kristalle vom XXIV, vom Smp. 120,5–123° (Zers.). Eine Probe gab nach dem Umlösen aus An Prismen vom Smp. 122–123,5° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = +25,3 \pm 2^\circ$  ( $c = 1,542$  in Me). Zur Analyse wurde 14 Std. bei 0,01 Torr und 20° getrocknet.

$C_{28}H_{38}O_8S$  (534,65) Ber. S 5,99% Gef. S 5,77%

213 mg XXIV vom Smp. 120,5–123° (Zers.) wurden in 2 ml trockenem Py und 1,5 ml Acetanhydrid 15 Std. bei 40° stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung resultierten 225 mg Rohprodukt. Aus An-Ä-Pn 208 mg zu Drusen vereinigte Nadeln von XXV, vom Smp. 147–150° (Zers.). Nach Umlösen aus An-Ä-Pn stieg der Smp. (nach rascherem Erhitzen) auf 154–154,5° (Zers.);  $[\alpha]_D^{21} = +31,6 \pm 2^\circ$  ( $c = 1,646$  in Chf). – 110 mg ML von XXIV wurden wie oben acetyliert und anschließend an 4 g Silicagel chromatographiert. Bz-Chf-(3:7) und Chf eluierten 100 mg Substanz. Aus An-Ä-Pn 59 mg Kristalle XXV vom Smp. 153–153,5° (Zers.).

b) Aus dem Ester X. 160 mg Ester X vom Smp. 195–197° wurden wie unter a) beschrieben zunächst 15 Std. bei 20°, hierauf noch 15 Std. bei 30° tosyliert. Das rohe Tosylat XXV (187 mg) gab nach 2maligem Umlösen aus An-Ä-Pn 93 mg zu Drusen vereinigte Nadeln vom Smp. 154,5–155° (Zers.). Die Mischprobe wie auch das Verhalten im Dünnschichtchromatogramm ergab völlige Identität mit dem aus IX bereiteten Ester XXV.

3 $\beta$ -Acetoxy-5-hydroxy-14,15 $\beta$ -epoxy-ätien-(16)-säure-methylester (XXIX) aus dem Ester XXV. 255 mg Ester XXV vom Smp. 152–153° (Zers.) wurden in wenig Bz gelöst, auf eine mit Pe-Bz-(3:1) bereitete Säule von 8 g  $Al_2O_3$  («MERCK» standardisiert nach BROCKMANN, pH = 9,5) gegeben und nach völligem Eindringen in die Säule 15 Std. bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde das Chromatogramm in üblicher Weise nach der Durchlaufmethode entwickelt (Fraktionen zu je 25 ml). Aus den mit Pe-Bz-(1:3) (2 Fraktionen), Bz (4 Fraktionen), Bz-Chf-(19:1), -(9:1) und -(4:1) (je 2 Fraktionen) eluierten Anteilen (total 105 mg) konnten 98 mg Kristalle von XXIX erhalten werden, Smp. 161–163°. Umlösen aus An-Ä-Pn gab zu Drusen vereinigte Nadeln vom Smp. 162–163°;  $[\alpha]_D^{21} = +78,1 \pm 2^\circ$  ( $c = 1,27$  in Chf). UV.-Absorptionsspektrum:  $\lambda_{max} = 233 \mu$ ,  $\log \epsilon = 3,72$  (in Al). – Die späteren Eluate (total 102 mg Eindampfdruckstand) bestanden nach Dünnschichtchromatogramm zur Hauptsache aus Ausgangsester XXV. Sie wurden nochmals an einer mit Bz bereitete  $Al_2O_3$ -Säule (4 g) adsorbiert und nach 42stdg. Verweildauer in gleicher Weise wie nach dem Durchlaufverfahren eluiert. Es wurden aus den ersten Eluaten erhalten: 27 mg XXIX und 18 mg XXV. Die mit Bz-Chf-(3:2) und -(3:7) eluierten Anteil (total 36 mg) gaben aus Chf-Ä 17 mg Kristalle vom Smp. 200–240°, die nach dem Acetylieren 14 mg Kristalle von XXIX vom Smp. 157–162° gaben. Schliesslich lieferten die mit Chf und Chf-Me-(9:1) eluierten Anteile (total 20 mg) aus An-Ä 7 mg Kristalle vom Smp. 115–122° (Zers.) (=XXIV). [Nach Acetylierung: Ester XXV vom Smp. 154–154,5° (Zers.).]

3 $\beta$ -Acetoxy-5-hydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\beta$ H-ätiansäure-methylester (XXX) aus Ester XXIX. 116 mg Ester XXIX vom Smp. 159–163° wurden in wasserfreiem Al gelöst, mit 240 mg 10-proz. Pd-Kohle versetzt und 3 $\frac{1}{2}$  Std. bei 20° in der Schüttelbirne hydriert, wobei 24,4 ml  $H_2$  aufgenommen wurden. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und an 4 g  $Al_2O_3$  chromatographiert. Mit Pe-Bz-(1:3) liessen sich 39 mg roher Ester XXX eluieren.

Aus Ä-Pn 22 mg zu Drusen vereinigte Nadeln vom Smp. 150–155°. Die aus der Mutterlauge gewonnene Kristallfraktion schmolz bei 153–157°;  $[\alpha]_D^{21} = +57,9^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,90$  in Chf)<sup>28)</sup>.

*3β-Acetoxy-5,14-dihydroxy-5β,14β,17βH-ättiansäure-methylester (XXXI)*. – a) *aus Ester XXXI*. In Fortsetzung des obigen Chromatogramms eluierten Bz-Chf-(4:1) und -(3:2) 50 mg rohen Ester XXXI. Aus An-Ä 26 mg zu Drusen vereinigte Prismen vom Smp. 184–186°;  $[\alpha]_D^{21} = +12,4^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,50$  in Chf) und 11 mg vom Smp. 180–184°. Die Mischprobe mit dem aus Telocinobufagin erhaltenen Ester XXXI vom Smp. 185–186° [siehe weiter unten sub b)] gab keine Depression.

b) *aus Acetyl telocinobufagin (XXVIII)*. 100 mg *3β-Acetoxy-5,14-dihydroxy-20-keto-5β,14β,17αH-pregnan-21-säure-lacton-(21→14)*<sup>15)</sup> (XXXII) vom Smp. 222–225°, das als Neutralstoff beim  $KMnO_4$ -Abbau von XXVIII erhalten worden war<sup>13)</sup>, wurde mit 1,0 g KOH in 4 ml W und 4 ml Me 30 Min. auf dem Dampfbad unter Rückfluss gekocht. Nach Entfernen des Me im Vakuum und Zufügen von soviel W, dass das ausgeschiedene K-Salz eben in Lösung ging, wurde mit verd. HCl bei 0° vorsichtig kongosauer gemacht, die ausgefallene Säure abgenutscht, mit W neutral gewaschen, in 5 ml W und 40 mg  $KHCO_3$  gelöst, mit 1 ml 30-proz.  $H_2O_2$  versetzt und 15 Std. bei 20° stehengelassen. Nun wurde mit verd.  $H_2SO_4$  angesäuert, mit Essigester ausgeschüttelt, die Essigesterauszüge einmal mit W gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft. Nach Acetylierung des Rückstandes in  $Py-(Ac)_2O$  und üblicher Aufarbeitung wurde an  $Al_2O_3$  chromatographiert. Die mit Bz-Chf-(19:1), -(9:1), -(4:1) und -(3:2) eluierten Anteile (total 60 mg) gaben nach 2maligem Umlösen aus An-Ä zu Drusen vereinigte Prismen von XXXI vom Smp. 184–186°.

*3β,5,14,20-Tetrahydroxy-21-nor-5β,14β,17αH-pregnan (XXVI) und 3β,20-Diacetoxy-5,14-dihydroxy-21-nor-5β,14β,17αH-pregnan (XXVII) aus dem Ester XXV*. 93 mg XXV vom Smp. 154–155° (Zers.) wurden in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst, bei 0° allmählich mit 500 mg  $LiAlH_4$  versetzt und das Reaktionsgemisch 14 Std. bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde unter Kühlen mit verd.  $H_2SO_4$  kongosauer gemacht, die Lösung im Vakuum vom Tetrahydrofuran befreit und im Scheidetrichter mit Chf-Al-(9:1) ausgezogen. Die organische Phase gab nach dem Neutralwaschen, Trocknen über  $Na_2SO_4$ , Abfiltrieren und Verdampfen im Vakuum 68 mg Rohprodukt. Nach 2maligem Umlösen aus Me-Ä 14 mg zu Drusen vereinigte Prismen (= XXVI) vom Smp. 217–250°. Acetylierung dieser Kristalle (in  $Py-(Ac)_2O$ ) gab nach üblicher Aufarbeitung 16 mg Rohprodukt. Aus An-Ä-Pn 9 mg farblose Plättchen (XXVII) vom Smp. 157–162°, nach zweimaligem Umlösen Smp. 161–163,5°;  $[\alpha]_D^{24} = +44,0^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,72$  in Chf). (Der früher<sup>12)</sup> beschriebene Doppel-Smp. 149,5–152°/161–164° konnte hier nicht beobachtet werden. Im Dünnschichtchromatogramm [Pe-Essigester-(1:1)] zeigten aber beide Ester dieselben Laufstrecken.) – Aus den ML von XXVI (54 mg) liessen sich nach Acetylierung und Chromatographie an  $Al_2O_3$  mit Bz-Chf-(3:2) noch 25 mg (roh) des Esters XXVII eluieren, die zwar schon bei 150–152° schmolzen, sich aber im Dünnschichtchromatogramm als einheitlich erwiesen und sich dabei wie das bei 161–163,5° schmelzende Produkt verhielten. Die späteren Eluate waren nicht einheitlich und enthielten auf Grund des Dünnschichtchromatogramms neben XXVII noch 4 weitere nicht identifizierte Substanzen.

#### SUMMARY

The structure of cinobufotalin is shown to be *3β,5-dihydroxy-14,15β-epoxy-16β-acetoxy-5β-bufa-20,22-dienolide*.

Pharmazeutisches Institut der Universität Basel

<sup>28)</sup> P. SPEISER & T. REICHSTEIN<sup>14)</sup> fanden den Doppel-Smp. 75°/155° und  $[\alpha]_D = +59^\circ$  (in Chf); vgl. hierzu auch *Helv.* 37, 622 (1948).