

Darstellung von Cassaidin-7 α -T und Cassaidinsäure-7 α -T

Ulrich ZELCK, Johannes MALUR und Kurt R. H. REPKE*

Aus dem Institut für Biochemie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Lindenberger Weg 70, Berlin-Buch — DDR.

Eingegangen am 6-3-1969

SUMMARY

Cassaidine-7 α -T and cassaidic acid-7 α -T (specific activities 20 mC/mMole) are prepared by reduction of the C-7 keto group of cassaine with sodium borohydride-T (specific activity 80 mC/mMole) eventually followed by acid hydrolysis of the alkaloid. The reduction of the partially hindered keto group yields exclusively the equatorial alcohol. The unexpected absence of the axial alcohol is shown to be due to steric exclusion of its formation by the neighbored cis-positioned methyl group at C-14. The labelled compounds are suited for the exploration of the occurrence of primary oxidation-reduction reactions at C-7 in the animal metabolism and, if this is excluded, for the clarification of the general metabolic fate of Erythrophleum alkaloids.

ZUSAMMENFASSUNG

Cassaidin-7 α -T und Cassaidinsäure-7 α -T (spezifische Aktivität jeweils 20 mC/mMol) werden dargestellt durch Reduktion der Ketogruppe an C-7 von Cassain mit Natriumborhydrid-T (spezifische Aktivität 80 mC/mMol), gegebenenfalls gefolgt von saurer Hydrolyse des Alkaloids. Die Reduktion der teilweise gehinderten Ketogruppe liefert ausschließlich den äquatorialen Alkohol. Wie gezeigt wird, geht die unerwartete Abwesenheit des axialen Alkohols auf den sterischen Ausschluß seiner Bildung durch die benachbarte cis-ständige Methylgruppe an C-14 zurück. Die markierten Verbindungen sind geeignet zur Erforschung des Vorkommens von primären Redoxreaktionen an C-7 im tierischen Organismus und, wenn dies ausgeschlossen ist, zur Abklärung des allgemeinen Stoffwechsel-Schicksals der Erythrophleum-Alkaloide.

* Herrn Professor Karl Lohmann zum 70. Geburtstag.

EINFÜHRUNG.

Auf Grund ihrer digitalisartigen Wirkung auf das Herz ⁽¹⁾ und auf das Digitalis-Rezeptorferment ⁽²⁾ haben die Erythrophleum-Alkaloide in den letzten Jahren zunehmend Interesse gefunden. Obwohl eine Reihe chemisch-präparativer Arbeiten durchgeführt wurde ⁽³⁻⁹⁾, liegen noch keine Versuche zur radioaktiven Markierung vor. Für biochemische Untersuchungen benötigen wir ein herzwirksames Alkaloid mit selektiver Markierung und genügend hoher spezifischer Radioaktivität. Als einfachsten Weg zur Erfüllung dieser Forderungen wählten wir die Einführung von Tritium in den Perhydrophenanthren-Kern durch Reduktion der Carbonylgruppe an C-7 von Cassain mit Natriumborhydrid-T. Bei dieser Reduktion können *theoretisch* vor allem tritiiertes Cassaindin oder/und 7-epi-Cassaindin gebildet werden.

Engel ⁽¹⁰⁾, der zuerst die Reduktion von Cassain mit Natriumborhydrid durchführte, hat der Hydroxygruppe die äquatoriale β -Position zugeschrieben und das Produkt daher als identisch mit Cassaindin angesehen. Er berief sich dabei auf die von Barton ⁽¹¹⁾ formulierte Regel, daß sterisch ungehinderte Ketone *überwiegend äquatorialen* Alkohol liefern. Die betreffende Carbonylgruppe unterliegt jedoch einer gewissen sterischen Hinderung, da sie nach unserer Erfahrung mit bestimmten Carbonylreagentien wie 2,4-Dinitrophenylhydrazin kaum reagiert. Bei sterisch gehinderten Ketonen wird aber nach Barton ⁽¹¹⁾ *überwiegend axialer* Alkohol gebildet, so daß bei der Reduktion von Cassain auch oder sogar überwiegend das supponierte 7-epi-Cassaindin (mit axialer Position der Hydroxylgruppe) entstehen müßte. Arya ⁽¹²⁾ oder Turner *et al.* ⁽³⁾, die Cassainsäure oder Cassainsäure-Methylester mit Lithiumaluminiumhydrid beziehungsweise mit Natriumborhydrid reduzierten, haben jedoch wie Engel ⁽¹⁰⁾ geschlossen, daß in jedem Falle nur ein einziges Produkt mit β -Konfiguration der Hydroxylgruppe an C-7 resultiert. Schließlich haben Clarke *et al.* ⁽⁴⁾ ohne Angabe experimenteller Daten mitgeteilt, daß die Reduktion von Cassain mit Natriumborhydrid fast ausschließlich das 7 β -ol liefert. In keiner der angeführten Arbeiten wurde über eine chromatographische Analyse des Reduktionsprodukts berichtet, so daß die zitierten Angaben mit Vorbehalt beurteilt werden müssen.

Der stereochemische Verlauf der Reduktion mit komplexen Borhydriden wird von den Reaktionsbedingungen wie Lösungsmittel, Temperatur und Zugabemethode beeinflusst (Übersichten ^(13, 14)) und läßt sich daher im einzelnen Fall nicht sicher voraussagen. Bei den in der vorliegenden Arbeit zu beschreibenden Markierungsversuchen war daher Identität und Einheitlichkeit des Produkts, das bei der Umsetzung von Cassain mit Natriumborhydrid-T erhalten wird, eingehend zu prüfen.

ERGEBNISSE.

Die im Handel erhältlichen Cassain-Präparate erwiesen sich wegen beträchtlicher Verunreinigung mit anderen Alkaloiden als unbrauchbar für

die Umsetzung. Bei rigoroser Reinheitsprüfung fanden wir auch in einem zunächst für rein befundenen Präparat noch ein Fremddalkaloid (Anteil 1-2 %), das mit keiner der verglichenen Erythrophleum-Verbindungen chromatographisch identisch war (Abbildung 1) und das daher möglicherweise ein noch nicht beschriebenes Alkaloid darstellt. Bei der Behandlung mit Natriumborhydrid-T nahm es Tritium auf und lieferte ein polareres Produkt, das die chromatographische Identifizierung des Reaktionsprodukts von Cassain erschwerte. Das Fremddalkaloid wurde daher über präparative Dünnschichtchromatographie abgetrennt.

Da das Lösungsmittel beträchtlichen Einfluß auf die Ausbeute oder den zu verwendenden Überschuß an komplexem Hydrid haben kann (Literatur bei ⁽¹³⁾), führten wir zwecks Auffindung der Bedingungen für einen möglichst rationellen Einsatz von Natriumborhydrid-T Vorversuche mit verschiedenen Solventien durch. Dabei wurde gefunden, daß zur vollständigen Reduktion von Cassain mit Natriumborhydrid in *Methanol* ein Molverhältnis von 1 : 2, jedoch in *wässrigem Dioxan* nur ein Molverhältnis von 1 : 1 erforderlich ist. Die Markierung wurde daher in dem letztgenannten Lösungsmittel-Gemisch durchgeführt.

Bei der Umsetzung von reinem Cassain mit Natriumborhydrid-T (80 mC/mMol) wurde nach Überführung in das Hydrochlorid ein Produkt isoliert, dessen Radioaktivität (20 mC/mMol) beim mehrfachen Umkristallisieren aus

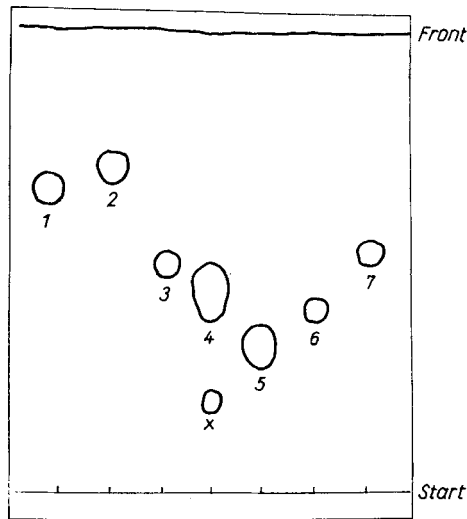


Abb. 1. Prüfung der Ausgangsverbindung Cassain (Präparat B. G. : Engel Bahn 4) auf Reinheit durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel HF₂₅₄ mit dem Fließmittel Cyclohexan : CHCl₃ : Methylamin (5 : 4 : 1). 1 = Erythrophleguin, 2 = Cassamin, 3 = Cassamidin, 4 = Cassain, 5 = Cassaidin, 6 = Coumidin, 7 = Erythrosuamin, x = unbekanntes Alkaloid. Lokalisation der Verbindungen mit Dragendorff's Reagenz.

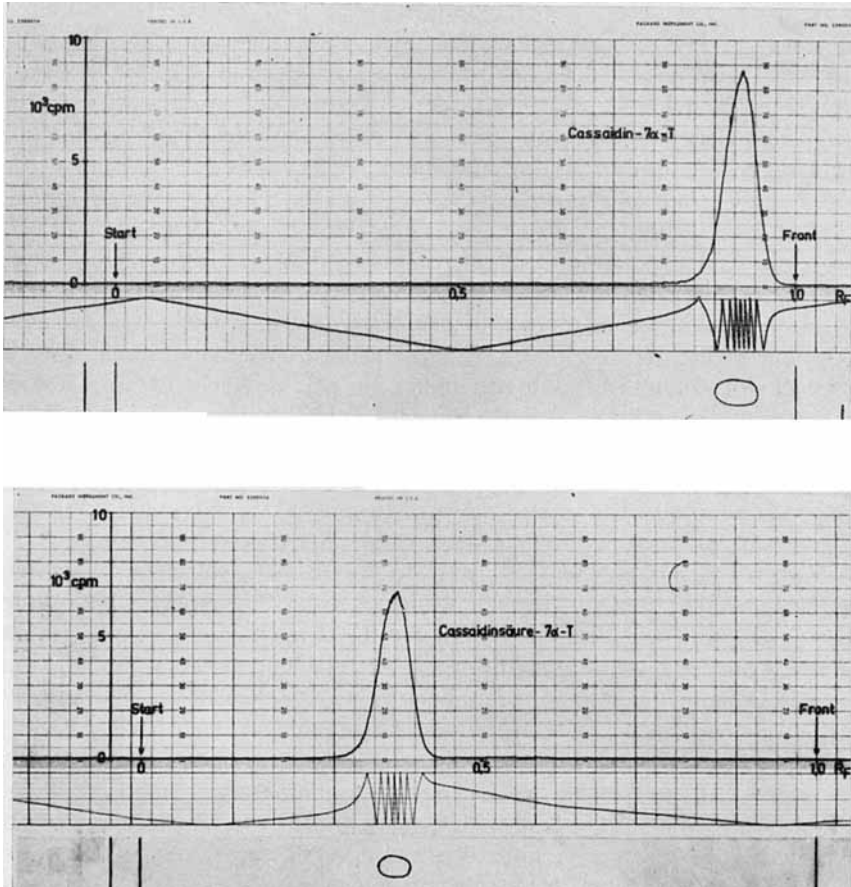


ABB. 2. Prüfung der markierten Derivate auf radiochemische und chemische Reinheit durch Papierchromatographie mit dem Fließmittel Methyläthylketon-tertiäres Butanol-Trimethylamin-Wasser (300 : 20 : 15 : 70): a) Cassaidin-7 α -T, b) Cassaidinsäure-7 α -T. Die Lokalisation und Höhe der Radioaktivität wurde mit dem Scanner und Integrator gemessen. Das Alkaloid oder die Säure wurden mit Dragendorff's Reagens beziehungsweise mit dem KMnO_4 -Spray lokalisiert (jeweiliger Streifen des Papierchromatogramms unter der Scanner-Aufzeichnung).

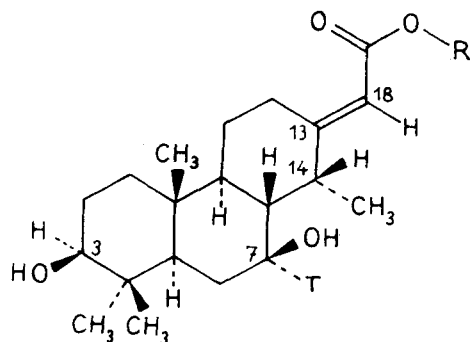
Methanol konstant blieb. Als Ort der stabilen Tritiummarkierung kam außer der gewünschten Reduktion der Ketogruppe an C-7 auch die Sättigung der C,C-Doppelbindung Δ^{13} (13) in Frage, da unter vergleichbaren Bedingungen die Reduktion solcher Doppelbindungen wiederholt beobachtet worden ist (Literatur bei (13)). Nach Behandeln des 7 β -ols Cassaidin mit Natriumborhydrid-T wurden in dem isolierten Material aber nur 0.15 % der Radioaktivität gefunden, die bei Einsatz des 7-Ketons Cassain resultiert hatten. Auf Grund dieses Ergebnisses kann das oben beschriebene Produkt hoher spezifischer Aktivität praktisch nur durch Reduktion der Carbonylgruppe an C-7 von Cassain entstanden sein.

Zwecks Klärung der Frage der Epimerenbildung wurde das Produkt einer eingehenden Analyse durch Verteilungs- und Adsorptionschromatographie mit zahlreichen Lösungsmittel-Systemen (vergleiche experimentellen Teil) unterworfen, darunter auch der Prüfung in dem System, das die beiden C-7-Epimeren der 14 β -Methylanalogen (vergleiche Diskussion) trennen läßt (4). Unter allen Bedingungen resultierte immer nur eine einzige, wohlumschriebene Ansammlung von Radioaktivität in Höhe von authentischem Cassaidin (Abbildung 2). Danach wird überraschend *ausschließlich* das 7 β -OH Epimere gebildet. Bemerkenswerterweise wird bei der Reduktion von Cassain mit Lithiumaluminiumhydrid statt Natriumborhydrid — nach den chromatographischen Analysen zu urteilen — gleichfalls nur Cassaidin erhalten.

Zwecks Sicherung der Identität des oben beschriebenen, markierten Produkts haben wir es der Hydrolyse unterworfen. Die isolierte Säure zeigte die gleiche spezifische Radioaktivität wie das eingesetzte Alkaloid (20 mC/mMol), wonach dessen Dimethylaminoethanol-Komponente Tritium nicht in nachweisbarem Umfang aufgenommen hatte. Bei der chromatographischen Analyse in verschiedenen Lösungsmittel-Systemen verhielt sich das saure Hydrolyseprodukt einheitlich wie authentische Cassaidinsäure (Abbildung 2). Wie bei dem Alkaloid ergab sich also auch bei seiner Stammsäure kein Hinweis auf die Anwesenheit des 7 α -OH Epimeren. Wenn dieses Epimere bei der angewandten Reduktionsmethode überhaupt gebildet wird, dann könnte sein Anteil in den untersuchten Produkten entsprechend der Empfindlichkeitsgrenze des angewandten Nachweisverfahrens nur weniger als 0.1 % betragen haben.

Nach den beschriebenen Beobachtungen wird Tritium praktisch ausschließlich an C-7 des Perhydrophenanthrenkerns addiert. Für die genaue Position des Tritiums sind die Feststellungen maßgebend, daß die markierten Produkte genau ein Viertel der spezifischen Aktivität des eingesetzten Natriumborhydrid-T aufwiesen und kein austauschbares Tritium (das nach Segel (15) in der gebildeten Hydroxylgruppe lokalisiert sein kann) enthielten.* Die Befunde insgesamt lassen den Schluß zu, daß den markierten Derivaten die Konstitution von Cassaidin-7 α -T zukommt :

* Diese Feststellungen stehen in Übereinstimmung mit den gegenwärtigen Anschauungen über den Mechanismus der Reduktion von Ketonen mit komplexen Borhydriden (Übersichten (13, 14)).



Cassaidin-7 α -T : R = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

Cassaindinsäure-7 α -T : R = $-\text{H}$

DISKUSSION.

Zur Erklärung der absoluten Stereospezifität der Reduktion von Cassain.

Unsere Feststellung, daß *ausschließlich* der äquatoriale Alkohol erhalten wird, ist nicht im Einklang mit der Barton'schen Regel, daß in Abhängigkeit vom Grade der sterischen Hinderung der *Ketongruppe* überwiegend eine äquatoriale oder axiale Hydroxylgruppe resultiert. Eine Erklärung bietet dagegen die von Cram und Greene⁽¹⁶⁾ vorgeschlagene Regel, die von der sterischen Hinderung des *Sauerstoffs* im Übergangszustand zur tetraedrischen Anordnung ausgeht. Danach koordiniert sich wahrscheinlich zunächst das Metall des komplexen Hydrids mit der Carbonylgruppe und dem Lösungsmittel. Der Carbonylsauerstoff wird dadurch zu einer stark raumfordernden Gruppe und dazu tendieren, sich zwischen die am wenigsten voluminösen Gruppen der Nachbarschaft zu orientieren. In der hier diskutierten Verbindungsklasse ist die angrenzende voluminöseste Gruppe die Methylgruppe an C-14, die nach den Ergebnissen von Clarke *et al.*⁽⁴⁾ (vergleiche Tabelle 1) einen dirigierenden Einfluß auf die sterische Position der Hydroxylgruppe ausübt.

Zwecks quantitativer Erfassung der sterischen Behinderung der Hydroxylgruppe durch benachbarte Methyl- oder Methylengruppen haben wir die betreffenden Abstände zwischen den Atomkernen bei Perhydrophenanthren-Derivaten gleicher Ringverknüpfung vermessen. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, wird aus den verschiedenen Ketoverbindungen *unabhängig von der äquatorialen oder axialen Position* derjenige Alkohol bevorzugt gebildet, bei dem der gennante Abstand am größten ist. Mit der Verkürzung des Abstandes von 3.6 auf 2.8 Å nimmt der Anteil an gebildetem Alkohol von maximal 85 % auf maximal 27 % ab, um bei 2.4 Å auf Null zu fallen. Offenbar wird zwischen einem Abstand von 2.8 und 2.4 Å der durch die bezeichneten Kernabstände definierte, minimale Raumbedarf der Hydroxylgruppe unter-

TABELLE 1. Einfluß der sterischen Behinderung durch die Methyl- oder Methylengruppe an C-14 auf die Bildung von äquatorialem (7β -OH) oder axialem (7α -OH) Alkohol bei der NaBH_4 -Reduktion der Ketoderivate von Perhydrophenanthren-Verbindungen mit trans-Verknüpfung der Ringe A/B und B/C sowie gegebenenfalls C/D. Als Maß der Hinderung ist der Abstand zwischen den Atomkernen der Hydroxylgruppe und der Methyl- oder Methylengruppe benutzt, der an Dreiding-Molekülmodellen vermessen wurde. Die Tatsache, daß die Abstände bei den Epimeren differieren, ist durch die Verzerrung des Ringes C durch die exozyklische C,C-Doppelbindung $\Delta^{13(18)}$ beziehungsweise durch den Fünfferring D erklärt.

| Reduzierte Verbindung | Vermessene Gruppen | Abstand (Å) Anteil (%) | |
|--|---|------------------------|---------------------|
| Cassaidin 7-epi-Cassaidin ^b | 7β -OH \Leftrightarrow 14 α -Methyl | 3.5 | 100 ^a |
| | 7α -OH \Leftrightarrow 14 α -Methyl | 2.4 | 0 ^a |
| 3-Acetyl-14-epi-cassaidinsäure-methylester 3-Acetyl-7,14-epi-cassaidinsäure-methylester | 7β -OH \Leftrightarrow 14 β -Methyl | 2.8 | 22 ⁽⁴⁾ |
| | 7α -OH \Leftrightarrow 14 β -Methyl | 3.6 | 60 ⁽⁴⁾ |
| 7β -Hydroxysterioide ^c 7α -Hydroxysterioide ^c | 7β -OH \Leftrightarrow 14 β -Methylen ^d | 2.8 | bis 27 ^e |
| | 7α -OH \Leftrightarrow 14 β -Methylen ^d | 3.6 | 73-85 ^e |

^a Diese Arbeit. ^b Hypothetische Verbindung. ^c 3 Isomerenpaare.

^d Als Teil des Rings D. ^e Literatur bei ⁽¹³⁾.

schritten, der nach Messungen an Courtauld Atommodellen bei 2.5 Å liegt. Danach ist unsere Feststellung, daß bei der Reduktion von Cassain mit Natriumborhydrid das hypothetische 7-epi-Cassaidin nicht erhalten wird, offenbar allein durch die sterische Ausschließung seiner Bildung erklärt, das heißt, von der Wahl des Reduktionsmittels und der Reaktionsbedingungen unabhängig.

Zur biochemischen Anwendung der markierten Erythropleum-Verbindungen.

Nach dem Ergebnis der Testung am Digitalis-Rezeptorferment (NaK)-ATPase ⁽²⁾ (Tabelle 2) ist die Herzwirksamkeit des durch Reduktion erhaltenen Cassaidins gleich der Wirksamkeit des Naturprodukts und ähnlich der der Ausgangsverbindung Cassain einzuschätzen. Die eingangs gestellte Forderung der Herzwirksamkeit ist danach erfüllt. Das für Cassain beschriebene Verfahren eröffnet einen Weg zur selektiven Markierung derjenigen Erythropleum-Alkaloide, die wie Coumingin, Coumingidin, Cassamin, Erythropleguin, Ivorin oder Erythrosuamin an C-7 eine Ketogruppe haben. Die spezifische Radioaktivität der markierten Derivate läßt sich in Anpassung an die Erfordernisse des zu bearbeitenden biochemischen Problems ohne weiteres erheblich steigern, da Natriumborhydrid-T wesentlich höherer spezifischer Aktivität als hier verwandt im Handel erhältlich ist.

TABELLE 2. Testung der biochemischen Wirksamkeit einiger Alkaloide und eines herzwirksamen Steroids an der (NaK)-ATPase der Zellmembran des Herzmuskels von Meerschweinchen (Methodik bei ⁽²⁾).

| Verbindung | H ₅₀ ^a μ M |
|---|--------------------------------------|
| Cassain (Ausgangsverbindung) | 0.5 |
| Cassaidin (authentisches Präparat) | 0.4 |
| Cassaidin (Reduktionsprodukt von Cassain) | 0.3 |
| Ouabain (Vergleichsstandard) | 0.6 |

^a Konzentration, die für eine 50 %ige Hemmung des Enzymsystems benötigt wird.

Über die Stabilität der Tritiummarkierung im tierischen Stoffwechsel liegen noch keine speziellen Untersuchungen vor. Da wir beim Studium der Biotransformation des Cassains durch Leberschnitte oder -homogenate von verschiedenen Species *in vitro* das Reduktionsprodukt Cassaidin nicht gefunden haben ⁽¹⁷⁾, scheint es unwahrscheinlich, daß Redoxreaktionen an C-7 im Stoffwechsel der Erythrophleum-Alkaloide vorkommen. Die Entscheidung, ob Cassaidin-7 α -T und analog markierte Alkaloide *in vivo* unter Verlust des Tritiums zu den entsprechenden 7-Ketonen dehydrogeniert werden können, läßt sich mit Hilfe des von Wenzel *et al.* ⁽¹⁸⁾ für entsprechend markierte Steroidalkohole beschriebenen Verfahrens leicht treffen, bei dem Vorkommen und Geschwindigkeit der betreffenden Oxydation durch Messung von HTO in Harn oder Atemluft verfolgt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Fehlergrenze beträgt über 200° \pm 3°. Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte in wässriger Lösung mit dem Beckman DK-2A Spektralphotometer. Als Sorptionsmittel für die Dünnschichtchromatographie dienten Kieselgel G und Kieselgel HF₂₅₄ (Firma E. Merck AG, Darmstadt), als Fließmittel die Systeme Chloroform-Methanol (7 : 3), *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5), Cyclohexan-Chloroform-Diäthylamin (5 : 4 : 1) oder Cyclohexan-Chloroform-Methylamin (5 : 4 : 1). Außerdem wurde auf Al₂O₃ PF₂₅₄ (Fa. E. Merck) mit Tetrahydrofuran-Methylenchlorid (1 : 9) chromatographiert ⁽⁴⁾. Für die Papierchromatographie wurde das Papier 2043 *b* Mgl der Fa. Schleicher und Schüll benutzt. Chromatographiert wurde absteigend in den Fließmitteln Methyläthylketon-tert. Butanol-Trimethylamin-Wasser (300 : 20 : 15 : 70), Methyläthylketon-tert. Butanol-konz. Ammoniak-Wasser (300 : 20 : 15 : 70) oder Methyläthylketon-tert. Butanol-Wasser (300 : 15 : 70). Das Sichtbarmachen der Flecken erfolgte im UV-Licht (Spezial-Analysenlampe PL 320

HANAU, max. Intensität bei 254 nm) sowie durch Besprühen mit Dragen-dorff's Reagens⁽¹⁹⁾ oder mit 0.1 n KMnO_4 in 0.1 n H_2SO_4 ⁽²⁰⁾. Die Radioaktivität der Verbindungen wurde mit dem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer PACKARD-TRI-CARB Modell 4322 (Szintillator : 50 mg POPOP, 4 g POP, 120 g Naphthalin in 1 l Dioxan) gemessen. Die Verteilung und Aktivität der auf Dünnschichtplatten oder Papier chromatogrammen befindlichen markierten Derivate wurde mit dem Radiochromatogramm-Scanner PACKARD Modell 7201 bestimmt. — Das benutzte NaBH_4 -T stammte vom Radiochemical Centre, Amersham (England), TRA.45 und hatte nach dem Infrarotspektrum eine chemische Reinheit von 100 %.

Reinigung von Cassain. — Je 25 mg Alkaloid (Präparation von B. G. Engel) gelöst in 0.2 ml CHCl_3 , wurden strichförmig auf eine mit Kieselgel HF_{254} beschichtete Platte (Maße : 20 × 20 cm, Schichtdicke 0.25 mm) aufgetragen. Durch Entwicklung der Platten im System Cyclohexan-Chloroform-Methylamin (5 : 4 : 1) konnte das Fremdalcaloid klar von Cassain abgetrennt werden (vergleiche Abbildung 1). Das Cassain-haltige Band wurde aus der Schicht herausgeschabt und das Alkaloid mit Chloroform eluiert. Der Rückstand erwies sich bei chromatographischer Analyse in den obengenannten Lösungsmittelsystemen als einheitlich und identisch mit Cassain.

Cassaidin-7 α -T-hydrochlorid. — 19.0 mg ($5 \cdot 10^{-4}$ Mol, 40 mC) Natriumborhydrid-T (spezifische Aktivität 80 mC/mM) wurden in 3 ml 85-proz. wässer. Dioxan gelöst und unter leichtem Schütteln innerhalb von 20 Min. tropfenweise mit einer Lösung von 202.8 mg ($5 \cdot 10^{-4}$ Mol) Cassain in 5 ml Dioxan versetzt. Der Ansatz wurde 15 Stdn. (über Nacht) bei 20° stehen gelassen. Nach dünn-schichtchromatographischer Feststellung der Vollständigkeit der Reaktion wurde mit 0.2 ml Eisessig neutralisiert, nach Beendigung der Wasserstoffentwicklung mit 5 ml Wasser versetzt und i.Vak bei einer Wasserbadtemperatur von 60° auf ca. 5 ml eingengt. Die erhaltene wässer. Lösung wurde in einen Schütteltrichter überführt (z.T. auskristallisierte Substanz mehrfach mit CHCl_3 überspült) und 20 mal mit je 3 ml CHCl_3 für 5 Min extrahiert. Nach Einengen der vereinigten Extrakte i.Vak. (60°) und Trocknen über P_2O_5 i.Vak. wurde das Rohprodukt (Ausbeute 186 mg = 91 %) in 2 ml absol. Methanol gelöst, mit 0.1 ml konz. HCl versetzt und unter Umschütteln bis zur ersten bleibenden Trübung mit Äther versetzt. Das nach 48 Stdn. bei -15°C in verwachsenen Nadeln auskristallisierte Cassaidin-7 α -T. HCl wurde nach Dekantieren mit wenig kaltem Äther gewaschen und über P_2O_5 i. Vak. (0.1-1 Torr) bei 130° getrocknet. Ausbeute 118 mg. Schmp 235-237° *. Das Produkt gab bei Mischung mit authentischem Cassaidinhydrochlorid keine Depression des Schmelzpunktes und war dünn-schichtchromatographisch mit

* Ruzicka und Dalma⁽²¹⁾ bestimmten den Schmp. des Cassaidinhydrochlorids im Hochvakuum zu 251°, den der Cassaidinsäure unter gleichen Bedingungen zu 275-277°; Engel⁽¹¹⁾ fand (ebenfalls im Hochvakuum) einen Schmp. von 246-249° für die Base und von 278-279° für die Säure.

der Vergleichssubstanz identisch (Abbildung 2). UV (H₂O) : λ_{\max} 230 nm, $\epsilon = 16850$. Die spezifische Aktivität betrug 20 mC/mM.

Cassaidinsäure-7 α -T. — 20.0 mg ($4.5 \cdot 10^{-5}$ Mol) Cassaidin-7 α -T·HCl wurden mit 0.8 ml 1*n* HCl versetzt, durch kurzes Erhitzen zum Sieden gelöst und 5 Std. unter Rückfluß gekocht. Der größte Teil der entstandenen Cassaidinsäure-7 α -T fiel bereits während der Reaktion in Form farbloser Kristalle aus. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz 2 Stdn. bei 0° stehen gelassen. Dann wurde über eine G4-Fritte abgesaugt, mit wenig Eiswasser gewaschen und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Ausbeute nach Umkristallisieren aus Essigester : 12.6 mg = 83 %. Schmp. 264-267°. Spezifische Aktivität : 20 mC/mMol. Die papier- und dünn-schichtchromatographische Prüfung ergab das Vorliegen einer chemisch und radiochemisch einheitlichen Verbindung, die mit einer Vergleichssubstanz identisch war (Abbildung 2).

DANKSAGUNG.

Für die Überlassung wertvoller Proben von Erythrophleum-Alkaloiden und ihrer Stammsäuren sind wir sehr zu Dank verpflichtet Herrn Prof. Dr. V. Prelog/Zürich (Cassain und Cassaidin·HCl aus dem Nachlaß von B. G. Engel) und Herrn Prof. Dr. F. Sandberg/Stockholm (Erythrophleguin, Cassamin, Cassamidin, Coumidin und Erythrosumin).

LITERATURVERZEICHNIS

1. MALING, H. M. und KRAYER, O. — *J. Pharm. Exp. Ther.*, **86** : 66 (1946).
2. PORTIUS, H. J. und REPKE, K. — *Arzneim.-Forsch.*, **14** : 1073 (1964).
3. TURNER, R. B., BURCHARDT, O., HERZOG, E., MORIN, R. B., RIEBEL, A. und SANDERS, J. M. — *J. Am. Chem. Soc.*, **88** : 1766 (1966).
4. CLARKE, R. L., DAUM, S. J., SHAW, P. E. und KULLNIG, R. K. — *J. Am. Chem. Soc.*, **88** : 5865 (1966).
5. DAUM, S. J., SHAW, P. E. und CLARKE, R. L. — *J. Org. Chem.*, **32** : 1427 (1967).
6. CLARKE, R. L., DAUM, S. J., SHAW, P. E., BROWN, JR., T. G., GROBLEWSKI, G. E. und O'CONNOR, W. V. — *J. Med. Chem.*, **10** : 682 (1967).
7. DAUM, S. J., RIANO, M. M., SHAW, P. E. und CLARKE, R. L. — *J. Org. Chem.*, **32** : 1435 (1967).
8. CLARKE, R. L., DAUM, S. J., SHAW, P. E., BROWN, JR., T. G., GROBLEWSKI, G. E. und O'CONNOR, W. V. — *J. Med. Chem.*, **10** : 593 (1967).
9. CLARKE, R. L. und DAUM, S. J. — *J. Med. Chem.*, **11** : 1069 (1968).
10. ENGEL, B. G. — *Helv. Chim. Acta*, **42** : 1127 (1959).
11. BARTON, D. H. R. — *J. Chem. Soc. (London)*, **1953** : 1027.
12. ARYA, V. — *J. Indian Chem. Soc.*, **38** : 419 (1961).
13. SCHENKER, E. — *Angew. Chemie*, **73** : 81 (1961).
14. HAJOS, A. — « Komplexe Hybride », in : « Organisch-präparative Methoden », VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **4** (1966).
15. SEGEL, K.-H. — *J. prakt. Chemie*, **13** : 152 (1961).
16. CRAM, D. J. und GREENE, F. D. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **75** : 6005 (1953).
17. ZELCK, U. und REPKE, K. — Abstracts Third FEBS Meeting, Academic Press, London and New York, S. 312 (1966).

18. WENZEL, M., KLEUCKER, H. und SCHULZE, P. E. — *Zschr. Naturforschung*, **21** : 1178 (1966).
19. MUNIER, R. und MACHEBŒUF, M. — *Bull. Soc. Chim. France*, **19** : 852 (1952).
20. ZÖLLNER, N. und WOLFRAM, G. — *Klin. Wschr.*, **40** : 1101 (1962).
21. RUZICKA, L. und DALMA, G. — *Helv. Chim. Acta*, **23** : 753 (1940).