

dungen so weit gelockert werden, dass das ursprünglich reaktionsfähige Serum nun bindungsbereite Gruppen enthält.

Zusammenfassung:

Die Plasmaproteine von Mensch, Pferd und Rind werden charakterisiert durch Aussalzungskurven sowie durch die Temperaturabhängigkeit ihrer Viskosität.

Es wird die Blutsenkungsreaktion von Mensch, Pferd und Rind verglichen und in Beziehung gebracht zu der Zusammensetzung der Plasmaproteine. Um auch den cellulären Faktor vergleichbar zu erfassen, wird als Standardflüssigkeit ein Pektinsol angegeben, welches isotonisch, isohydrisch und isoviskos ist mit normalem Blutplasma. Aus dem Senkungsablauf von gewaschenen Erythrocyten von Mensch, Pferd und Rind in dieser proteinfreien Standardflüssigkeit, und dem Vergleich ihrer Senkung im Blutplasma, sowie dessen Protein zusammensetzung, kann auf den cellulären Faktor (Ballungsbereitschaft der Erythrocyten) geschlossen werden.

Der Verfasser möchte den H.H. Prof. Dr. A. Krupski und Assistent Lehmann für ihr freundliches Interesse bestens danken.

Medizin. Universitätsklinik Zürich (Dir. Prof. Dr. W. Löffler).

50. Diginin und Diginigenin

4. Mitteilung¹⁾

von C. W. Shoppee²⁾

(10. II. 44.)

In der ersten Mitteilung³⁾ wurde auf Grund des starken Reduktionsvermögens des Diginigenins und seiner positiven Reaktion mit 1,4-Dioxy-naphtalin⁴⁾ die Vermutung ausgesprochen, dass es sich bei der für diese Reaktionen verantwortlichen Carbonylgruppe um eine Aldehyd-Gruppierung handeln könnte, nachdem das Vorhandensein einer α -Ketol-Gruppierung ausgeschlossen war. Allerdings ist die Probe mit 1,4-Dioxy-naphtalin nicht sehr beweiskräftig, da auch Ketone bekannt sind, die diese Reaktion geben⁵⁾⁶⁾. Diese Tatsache und besonders der Umstand, dass bei der milden Oxydation von

¹⁾ 3. Mitteilung: C. W. Shoppee, Helv. **27**, 246 (1944).

²⁾ Rockefeller Research Fellow an der Universität Basel.

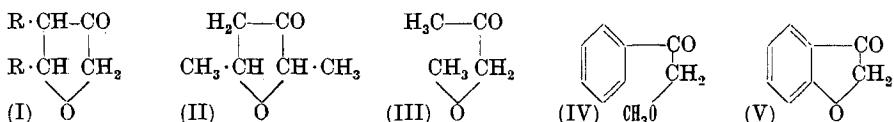
³⁾ C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. **23**, 975 (1940).

⁴⁾ H. Raudnitz, H. Puluj, B. **64**, 2212 (1931).

⁵⁾ K. Miescher, A. Wettstein, C. Scholz, Helv. **22**, 894 (1939), insbesondere 902.

⁶⁾ D. A. Prins, T. Reichstein, Helv. **24**, 945 (1941).

Diginigenin und seinem Monoacetat keine wohldefinierten Säuren entstehen, führte nunmehr zu der Auffassung, dass die reaktive Carbonylgruppe im Diginigenin als Ketogruppe vorliegt, und zwar in der Gruppierung $\equiv C-CO-CH_2-O-C\equiv$ [vgl. Formel (I)]. In der Literatur scheinen β -Keto- α' , β' -dialkyl-tetrahydrofurane (I) nicht beschrieben zu sein, lediglich eine sehr ähnliche Verbindung, das β -Keto- α , α' -dimethyl-tetrahydrofuran (II) wurde von *Dupont*¹⁾ dargestellt und seine Konstitution bewiesen.



Ausser der Substanz (II) wurden noch das Methoxy-aceton (III), das ω -Methoxy-acetophenon (IV) und das Cumaranon (V), die ebenfalls die Gruppierung $\equiv C-CO-CH_2-O-C\equiv$ enthalten, zum Vergleich herangezogen, mit dem Ergebnis, dass alle diese Substanzen ein starkes Reduktionsvermögen aufweisen und dass die Proben nach *Legal*²⁾ und *Zimmermann*³⁾ sowie die mit 1,4-Dioxy-naphtalin bei ihnen positiv ausfallen. Ferner werden (III), (IV) und (V), ebenso wie Diginigenin, von Alkali in der Wärme angegriffen, während bei der Behandlung von Diginigenin, ebenso wie von (II), mit Natriumäthylat eine rötlichgelbe Farbe auftritt. Diese Farbreaktion soll nach *Dupont* für β -Keto-tetrahydrofuran-Derivate charakteristisch sein.

Wie schon früher mitgeteilt wurde⁴⁾, gibt Diginigenin eine positive *Legal'sche* Probe, enthält aber keinen Lactonring. Zwar fällt diese Farbreaktion bei allen Herzgift-Aglykonen, für die ein $\Delta^{\alpha\beta}$ -gesättigter Lactonring charakteristisch ist, positiv aus, doch konnten *Jacobs* und *Elderfield* zeigen⁵⁾, dass sie nicht vom Vorhandensein eines Lactonringes abhängig ist. In Wirklichkeit weist die *Legal'sche* Probe nur auf eine aktivierte Methylengruppe hin. Für diesen Zweck scheint die *Zimmermann'sche* Probe ebenso brauchbar und allgemeinerer Anwendung fähig zu sein. Diginigenin gibt diese Reaktion, aber keines seiner Derivate, die durch Hydrierung oder Reduktion nach *Wolff-Kishner* entstanden sind⁶⁾ und eine =CHOH- bzw. =CH₂-Gruppe an Stelle der reaktiven Carbonylgruppe des Genins enthalten. Die Gegenwart der -CO-CH₂-Gruppe im Diginigenin,

¹⁾ *G. Dupont*, Ann. chim. [8] **30**, 485 (1913), insbesondere 535ff.

²⁾ *J. G. y Pereira, E. C. Lopez*, Ch. Z. **33**, 892 (1909); *H. Meyer*, Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen, 6. Auflage, 550 (Springer, Berlin 1938).

³⁾ *W. Zimmermann*, Z. physiol. Ch. **233**, 257 (1935); *N. H. Callow, R. H. Callow, C. W. Emmens*, Biochem. J. **32**, 1312 (1938); vgl. *A. Reissert*, B. **37**, 831 (1904).

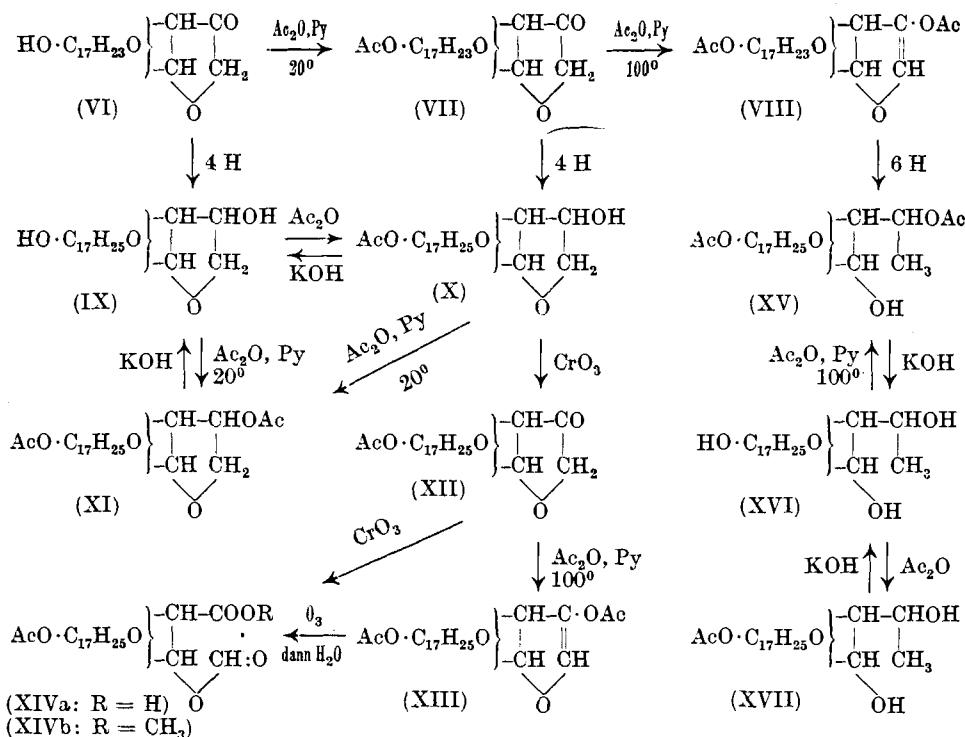
⁴⁾ *C. W. Shoppee, T. Reichstein*, Helv. **23**, 975 (1940).

⁵⁾ *W. A. Jacobs, R. C. Elderfield*, J. Biol. Chem. **91**, 628 (1931).

⁶⁾ Alle derartigen Derivate sind gegen Alkali stabil.

die durch die obigen Farbreaktionen wahrscheinlich gemacht war, konnte eindeutig bewiesen werden durch Kondensation mit Piperonal, wobei ein gelbes Piperonylidene-Derivat entstand.

Die für Diginigenin vorgeschlagene Teilformel (VI) wurde durch die folgende Befunde gestützt: bei milder Acetylierung entstand ein krystallisiertes Monoacetat (VII) (*Legal'sche Probe positiv*)¹⁾, während energische Acetylierung ein krystallisiertes Diacetat lieferte (*Legal'sche Probe negativ*)¹⁾, das als das Enol-Diacetat (VIII) aufgefasst wird²⁾. Das Tetrahydro-genin (IX), das durch kurzes Kochen mit Acetanhydrid in ein Monoacetat (X) vom Smp. 174°³⁾ übergeführt wird, gab bei energischer Acetylierung früher ein öliges Diacetat (XI), das jetzt durch Verwendung von Acetanhydrid und Pyridin bei 20° krystallisiert erhalten konnte. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass bei der Hydrierung von Diginigenin eine Kern-doppelbindung abgesättigt wird und eine neue, sekundäre Hydroxylgruppe entsteht.



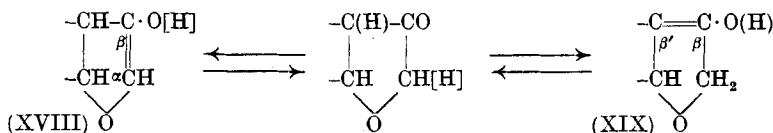
1) C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. **23**, 975 (1940).

2) Die dem früher beschriebenen Monosemicarbazon von (VIII) zu Grunde liegende Carbonylgruppe muss demnach die im Kern befindliche träge Ketogruppe sein.

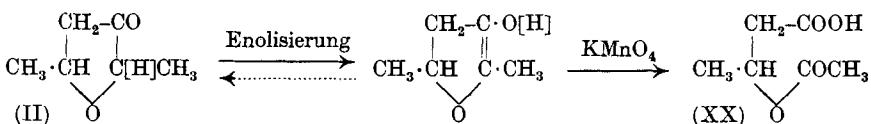
3) Eine zweite Krystallmodifikation vom Smp. 153° wird im exptl. Teil beschrieben.

Im Tetrahydro-genin-monoacetat (X) liess sich diese neue, sekundäre Hydroxylgruppe durch Oxydation mit Chromtrioxyd wieder in eine Ketogruppe überführen, wobei das Monoacetat (XII) entstand, das als schön krystallisiertes Semicarbazon charakterisiert wurde, starkes Reduktionsvermögen zeigte und die, drei genannten Farbreaktionen gab. Energische Acetylierung von (XII) lieferte eine ungesättigte Verbindung, die nicht krystallisierte. Anscheinend kommt ihr die Konstitution eines Enol-Diacetats (XIII) zu; denn bei der Ozonisierung und anschliessender Zersetzung des Ozonids mit heissem Wasser wurde eine krystallisierte Säure der Formel $C_{23}H_{32}O_7$ erhalten, die als Methylester charakterisiert wurde. Diese Säure wird als Formylester-Säure (XIVa) formuliert; ihr Methyl-ester reagierte nicht mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazinsulfat und reduzierte alkalische Silberdiamminlösung bei 20° nicht merklich, wohl aber in der Wärme. In Spuren wurde die Säure (XIVa) auch bei der Oxydation von (X) zu (XII) erhalten. Ihre Entstehung aus (XII) lässt sich vergleichen mit der von *Dupont*¹⁾ beobachteten Bildung von γ -Acetoxy-n-buttersäure (XX) aus (II) (vgl. weiter unten).

Die Acetate (VIII) und (XIII) wurden oben als Derivate eines $\Delta^{\alpha\beta}$ -Enols (XVIII) des β -Keto-tetrahydrofuran formuliert, obwohl die Entstehung eines $\Delta^{\beta\beta'}$ -Enols (XIX) nicht ausgeschlossen ist.



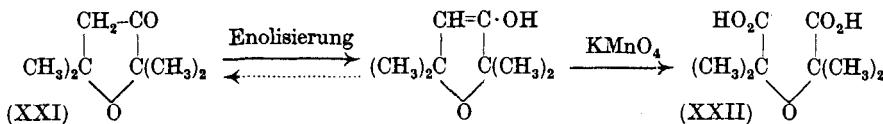
Diese Formulierung ist zwar willkürlich, erfährt aber eine Stütze durch die Befunde von *Dupont*¹⁾, wonach ausschliesslich die $\Delta^{\alpha\beta}$ -Enol-Form (XVIII) auftritt, auch wenn eine Enolisierung in beiden Richtungen möglich ist. So entsteht bei der Oxydation von β -Keto- α , α' -dimethyl-tetrahydrofuran (II) ausschliesslich γ -Acetoxy-n-buttersäure (XX), eine Reaktion, die nach Ansicht des Verfassers über das $\Delta^{\alpha\beta}$ -Enol verläuft²⁾:



Dagegen liefert die Oxydation von α , α , α' , α' -tetrasubstituierten Homologen (z. B. XXI), aus denen nur $\Delta^{\beta\beta'}$ -Enole entstehen können, Oxydo-dicarbonsäuren (z. B. XXII):

¹⁾ *G. Dupont*, Ann. chim. [8] 30, 485 (1913), insbesondere 535ff.

²⁾ In diesem Zusammenhang sei *Dupont's* Feststellung hervorgehoben, dass die Oxydation in neutraler Lösung sehr langsam, in alkalischer Milieo dagegen sehr schnell verläuft, was darauf hinweist, dass sie erst nach erfolgter Enolisierung stattfindet.



Wie schon früher ausgeführt wurde¹⁾, nimmt das Diacetat (VIII) bei der Hydrierung 6 Atome Wasserstoff auf. Dieser Befund, der ursprünglich schwer zu verstehen war, lässt sich erklären, wenn man das Diacetat (VIII) als $\Delta^{\alpha\beta}$ -Enol-Diacetat formuliert, und steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen von *Roger Adams*²⁾, wonach Tetrahydrofurane bei der Reduktion mit seinem Platinoxyd-Katalysator in Eisessig nicht angegriffen werden, während bei der Hydrierung von Furanen bedeutende Mengen von hexahydrierten Produkten auftreten. Im letzteren Falle erfolgt zunächst eine reduktive Spaltung des Oxydringes, und erst dann wird die Ringdoppelbindung abgesättigt. Das Auftreten der Hexahydro-Verbindung (XV) als Hydrierungsprodukt von (VIII) bildet daher in Analogie zu *Adam's* Befund eine Stütze für die Formulierung des Diacetats (VIII) als $\Delta^{\alpha\beta}$ -Enol-Acetat eines β -Keto-tetrahydrofurans.

Das ölige, gesättigte Diacetat (XV) wurde zum früher beschriebenen Hexahydro-genin (XVI)¹⁾ verseift und das letztere durch kurzes Kochen mit Acetanhydrid in ein Monoacetat (XVII) übergeführt. Energische Acetylierung von (XVI) lieferte nur ein öliges Diacetat, das möglicherweise mit (XV) identisch ist. Dass unter diesen Bedingungen kein Triacetat entstand, hängt vielleicht mit dem anormalen Verhalten von 16-Oxy-steroiden³⁾ zusammen.

Obwohl die bisher vorliegenden experimentellen Ergebnisse⁴⁾ noch nicht dazu berechtigen, dem Diginigenin die Formel eines Steroids zuzuerteilen, lassen sich doch alle gemachten Beobachtungen mit den hypothetischen Formeln für Diginigenin (XXIIIa) und sein Diginosid (Diginin) (XXIIIb) in Einklang bringen. Eine solche Formulierung zeigt auch die mögliche biogenetische Verwandtschaft mit den steroiden Digitalis-Saponinen und Sapogeninen (XXIV).

¹⁾ C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. **23**, 975 (1940).

²⁾ R. Adams, W. E. Kauffmann, Am. Soc. **45**, 3032 (1923).

³⁾ 3,16,27-Trioxo-cholesten-(5)⁵⁾, 3,16,27-Trioxo-cholestan⁵⁾ und Gitoxigenin⁶⁾ verhalten sich in bezug auf Veresterung und Verseifung an C₁₈ normal, während bei 3,16,27-Trioxo-koprostan⁷⁾ eine beträchtliche sterische Hinderung festgestellt wurde⁸⁾.

⁴⁾ Die Entstehung von Diginan⁹⁾ statt eines der bekannten steroiden Kohlenwasserstoffe könnte entweder durch eine Umlagerung bei der Wolff-Kishner-Reduktion erklärbar sein, oder durch die Bildung eines raumisomeren Kohlenwasserstoffes bei der Hydrierung der Doppelbindung, deren Lage unsicher ist.

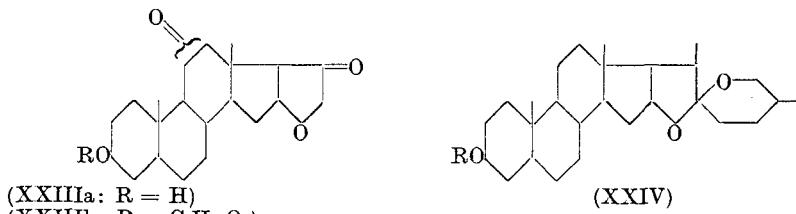
⁵⁾ R. E. Marker, D. L. Turner, Am. Soc. **63**, 767 (1941); vgl. R. E. Marker und Mitarb., Am. Soc. **62**, 525 (1940); **63**, 774, 779 (1941).

⁶⁾ W. Neumann, B. **70**, 1547 (1937).

⁷⁾ R. E. Marker, E. Rohrmann, Am. Soc. **61**, 846 (1939).

⁸⁾ R. E. Marker, E. M. Jones, J. Krueger, Am. Soc. **62**, 2532 (1940).

⁹⁾ C. W. Shoppee, Helv. **27**, 246 (1944).



(XXIIIa: R = H)
(XXIIIb: R = C₇H₁₃O₃)

Die Doppelbindung
ist weggelassen worden.

An dieser Stelle möchte ich nochmals der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Cie. A.G.* Basel, für die ursprüngliche Überlassung von Diginin danken.

Experimenteller Teil.

Alle Schmelzpunkte sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert
(Fehlgrenze $\pm 2^\circ$).

Piperonylidene-Derivat des Diginigenins (VI).

7 mg Diginigenin (VI) vom Smp. 110—112° und 3,3 mg Piperonal (= 1,1 Mol) wurden in 0,1 cm³ absolutem Äthanol gelöst, mit 0,3 cm³ einer bei 0° gesättigten Lösung von Chlorwasserstoff in absolutem Äthanol versetzt und 16 Stunden stehen gelassen. Die tief violett gefärbte Lösung wurde im Vakuum bei 30° weitgehend vom Äthanol befreit und mit wenig Wasser versetzt, wobei die Färbung verschwand und ein hellgelber Niederschlag ausfiel. Er wurde abgenutscht, mehrmals mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Aus Äther-Pentan umkristallisiert, wurden sehr kleine gelbe Würfel vom Smp. 128—131° erhalten. Zur Analyse wurde bei 70° im Hochvakuum 1 Stunde getrocknet, dann unmittelbar vor der Verbrennung nochmals bei 100° im Hochvakuum, und im Schweinchen eingewogen.

1,912 mg Subst. gaben 4,925 mg CO₂ und 1,201 mg H₂O
C₂₉H₃₂O₆·H₂O (494,56) Ber. C 70,42 H 6,93%
Gef. „ 70,30 „ 7,03%

Der Analyse nach handelt es sich um ein Hydrat; die Möglichkeit, dass die Substanz das primäre Addukt, R·CO·CH—CH(OH)·C₇H₅O₂, darstellt, ist durch die gelbe Farbe ausgeschlossen. Vielleicht ist die zusätzliche Molekel Wasser an die freie sekundäre Hydroxylgruppe des Diginigenins gebunden.

Tetrahydro-diginigenin-monoacetat (X).

Zu einem vorhydrierten Katalysator aus 10 mg Platin(IV)-oxyd in 0,5 cm³ Eisessig fügte man eine Lösung von 30 mg Diginigenin-monoacetat (VII)¹ in Eisessig und hydrierte bei 17°. Nach 3-stündigem Schütteln waren 3,6 cm³ Wasserstoff aufgenommen (ber. für 2 Mol H₂ 3,5 cm³), und die Hydrierung stand still. Es wurde filtriert, im Vakuum eingedampft, in Äther gelöst, mit Sodalösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt, wobei Oktaeder vom Smp. 154—156° erhalten wurden. Nochmals aus Äther umkristallisiert, schmolzen die Krystalle bei 156°. Zur Analyse wurden sie fein verrieben und bei 100° im Vakuum getrocknet.

5,236 mg Subst. gaben 13,570 mg CO₂ und 4,010 mg H₂O
C₂₃H₃₄O₅ (390,50) Ber. C 70,75 H 8,78%
Gef. „ 70,73 „ 8,60%

Offenbar handelt es sich um eine zweite Krystallmodifikation, denn durch Impfen der Äther- oder Methanol-Lösung mit der vorbeschriebenen²) Form vom Smp. 174° wurden

¹⁾ C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. 23, 983 (1940).

²⁾ C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. 23, 987 (1940).

die charakteristischen zugespitzten Prismen wie früher erhalten. Ein Gemisch der beiden Krystallformen schmolz von 159—173°, zeigte also keine Erniedrigung. Bei der Verseifung der Oktaeder vom Smp. 156° wurde eine sehr reine Probe des Tetrahydro-diginigenins (IX) vom Smp. 231° erhalten.

Tetrahydro-diginigenin-diacetat (XI).

200 mg Tetrahydro-diginigenin (IX) wurden in 1,2 cm³ reinstem Pyridin gelöst, mit 1 cm³ Acetanhydrid versetzt und 16 Stunden bei 15° stehen gelassen. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde ein Öl erhalten, das beim Animpfen mit dem Tetrahydro-diginigenin-monoacetat (X) vom Smp. 174° nicht krystallisierte. Es wurde in wenig Benzol gelöst und über eine mit Pentan bereitete Säule aus 6 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Die mit Benzol-Pentan-Mischungen und mit absolutem Benzol erhaltenen Eluate wurden in wenig Äther gelöst, mit etwas Pentan versetzt und bei 15° stehen gelassen, wobei sich Prismen vom Smp. 120° ausschieden. Aus Äther-Pentan umkrystallisiert wurden schöne grosse Prismen vom Smp. 120—121° erhalten, die eine spez. Drehung $[\alpha]_D^{17} = +17^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,057$ in Aceton) zeigten:

$$10,721 \text{ mg Subst. zu } 1,0141 \text{ cm}^3 : l = 1 \text{ dm} : \alpha_D^{17} = +0,18^\circ \pm 0,02^\circ$$

Zur Analyse wurde bei 60° im Hochvakuum getrocknet.

3,792 mg Subst. gaben	9,600 mg CO ₂	und 2,894 mg H ₂ O
16,7 ± 0,2 mg Subst. verbrauchten	3,78 cm ³	0,02-n. KOH
C ₂₅ H ₃₆ O ₆ (432,54)	Ber. C 69,25	H 8,37 —COCH ₃ 19,4%
Gef. „ 69,09 „ 8,54 „ 19,0%		

Die Aufarbeitung des Verseifungsansatzes gab das Tetrahydro-diginigenin (IX) vom Smp. 226—228°, Mischschmelzpunkt ebenso, zurück.

Dihydro-diginigenin-monoacetat (XII) aus (X).

130 mg reines (X) vom Smp. 173—174° wurden in 1,65 cm³ Eisessig gelöst, mit 1,65 cm³ einer 2-proz. Chromtrioxyd-Eisessig-Lösung (= 33 mg CrO₃) versetzt und 16 Stunden bei 15° stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum bei 30° fast zur Trockne gedampft, mit wenig Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung enthielt keine unverbrauchte Chromsäure mehr. Die Ätherlösung wurde mit etwas verdünnter Schwefelsäure, mit Sodalösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Das Neutralprodukt (123 mg) wurde als farbloser Schaum erhalten, der nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte. Er reduzierte alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur rasch, auch fielen die Proben nach Raudnitz-Puluj, Legal und Zimmermann positiv aus. Mit Tetranitromethan zeigte er keine Gelbfärbung. Mit Semicarbazid-acetat liess es sich leicht in ein gut krystallisiertes Semicarbazon überführen, das sich aus Methanol in Drusen von Nadeln vom Smp. 226° (ohne Zers.) ausschied. Zur Analyse wurde bei 90° und 0,01 mm getrocknet.

2,474 mg Subst. gaben	0,212 cm ³ N ₂ (18°, 731 mm)
C ₂₄ H ₃₅ O ₅ N ₃ (445,52)	Ber. N 9,43 Gef. N 9,67%

Aus der soda-alkalischen Waschlösung wurden 4 mg saure Oxydationsprodukte erhalten. Aus Äther liessen sich durch Einengen 2 mg farblose Prismen vom Smp. ca. 290° (unter Braunfärbung) isolieren. Diese Säure wurde mit Diazomethan in den Methylester übergeführt, der aus Äther in langen Nadeln vom Smp. 203—204° krystallisierte (vgl. weiter unten).

Dihydro-diginigenin-diacetat (XIII) und sein Abbau mit Ozon zur Ester-säure (XIVa).

110 mg amorphes Monoacetat (XII) wurden mit 0,5 cm³ Acetanhydrid und 0,6 cm³ reinstem absolutem Pyridin in einem zugeschmolzenen Röhrchen 2 Stunden auf 100°

erhitzt. Nach dem Aufschneiden des Röhrchens wurde der Inhalt mit etwas Äther herausgespült, im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther gelöst, mit 2-n. Salzsäure, 2-n. Sodalösung und Wasser gewaschen, getrocknet, stark eingeengt und mit Pentan versetzt. Beim Stehen bei -15° schieden sich keine Krystalle aus; auch aus Methanol bei -15° konnten keine Krystalle erhalten werden. Daher wurde das Produkt über eine mit Pentan bereitete Säule aus 4 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Die mit Pentan und Benzol-Pentan-Mischungen erhaltenen Eluate gaben fast keine Eindampfrückstände; diejenigen mit Benzol und Benzol-Äther-Mischungen lieferten viel farbloses Öl, das bei -15° nicht zur Krystallisation zu bringen war. Mit Äther wurden nur Spuren von gelblichem Öl erhalten.

Die mit Benzol und Benzol-Äther-Mischungen erhaltenen Eluate wurden vereinigt, wobei 90 mg farbloses Öl, das mit Tetranitromethan eine starke Gelbfärbung zeigte, erhalten wurden. Es wurde in $2,5 \text{ cm}^3$ gereinigtem Chloroform gelöst und bei 0° während 30 Minuten ein ca. 4% Ozon enthaltender Sauerstoffstrom ($50 \text{ cm}^3/\text{Min.}$) in die Lösung eingeleitet. Dann wurde im Vakuum eingedampft, mit 5 cm^3 Wasser versetzt und im Stickstoffstrom destilliert. Dabei waren hinter der Destillationsvorlage ein Lösung von p-Nitro-phenylhydrazin-hydrochlorid, eine wässrige Lösung von Bariumhydroxyd und schliesslich konz. Natronlauge angeschlossen, doch wurde kein flüchtiger Stoff aufgefangen. Der schwerflüchtige Rückstand wurde mehrmals mit Äther ausgezogen und die vereinigten Extrakte mit 2-n. Sodalösung und mit eiskalter n. Natronlauge ausgeschüttelt. In den Laugen-Auszügen war keine Quasi-Säure oder Lacton enthalten. Aus der verbleibenden Ätherlösung wurde als Neutralprodukt nur Öl (29 mg) isoliert, das nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte. Dagegen fanden sich in den angesäuerten und ausgeätherten Soda-Auszügen 30 mg einer Säure, die beim Einengen der Ätherlösung ausfiel. Nach Waschen mit Äther wurde sie aus Dioxan-Äther umkristallisiert, wobei 12 mg glänzende Prismen der Säure (XIVa) vom Smp. $302-304^{\circ}$ (ohne Zers.) erhalten wurden. Eine Probe wurde mit Diazomethan in den Methylester (XIVb) übergeführt und aus Äther umkristallisiert. Dieser stellte schöne lange Nadeln vom Smp. $203-204^{\circ}$ dar und gab mit dem früher erwähnten Methylester vom gleichen Schmelzpunkt keine Erniedrigung. Zur Analyse wurde bei 85° und 0,01 mm getrocknet.

2,323 mg Subst. gaben $5,630 \text{ mg CO}_2$ und $1,659 \text{ mg H}_2\text{O}$

$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (434,51) Ber. C 66,33 H 7,89%

Gef. „, 66,14 „, 7,99%

Hexahydro-diginigenin (XVI).

Die von früheren Versuchen übrig gebliebene Menge des Hexahydro-diginigenin-diacetats (XV)¹⁾ wurde quantitativ verseift:

$39,2 \pm 0,2 \text{ mg Subst. verbrauchten } 4,30 \text{ cm}^3$ 0,02-n. KOH

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (434,6) Ber. $4,46 \text{ cm}^3$ 0,02-n. KOH für 2 Äquiv.

Das teilweise ausgefallene Hexahydro-diginigenin wurde abgenutscht, mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Es wog 20 mg, schmolz roh bei $202-206^{\circ}$ und zeigte mit dem Tetrahydro-diginigenin (IX) vom Smp. 229° vermischt eine starke Schmelzpunktserniedrigung bis auf ca. 180° . Es reduzierte alkalische Silberdiamminlösung bei 20° nicht und verhielt sich negativ bei der Raudnitz-Puluj'schen, der Legalschen und der Zimmermann'schen Probe. Das Filtrat wurde dreimal mit Äther ausgezogen, wobei noch 15 mg des gleichen Stoffes erhalten wurden, die nach Umkristallisieren aus Aceton-Pentan bei 200° schmolzen.

Hexahydro-diginigenin-monoacetat (XVII).

15 mg (XVI) vom Smp. $202-206^{\circ}$ wurden mit $0,5 \text{ cm}^3$ Acetanhydrid 5 Minuten zum Sieden erhitzt. Dann wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in wenig

¹⁾ C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. **23**, 989 (1940).

Äther gelöst, mit etwas Pentan versetzt und bei 0° über Nacht stehen gelassen. Es wurden Krystalle erhalten, die nach Waschen mit Äther-Pentan (1 : 4) und Pentan bei 82—83° schmolzen. Aus den Mutterlaugen wurde noch ein zweites Krystallisat vom Smp. 82—83° erhalten. Die vereinigten Krystalle (8 mg) wurden im Molekulkarkolben bei 120—130° Badtemperatur und 0,01 mm destilliert und das Destillat aus Äther-Pentan bei -15° umkristallisiert, wobei 5,5 mg Prismen vom Smp. 83° erhalten wurden. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 60° getrocknet.

3,342 mg Subst. gaben 8,670 mg CO₂ und 2,790 mg H₂O
C₂₃H₃₆O₅ (392,52) Ber. C 70,37 H 9,04%
Gef. , 70,79 , 9,34%

Hexahydro-diginigenin-diacetat (XV) (?).

10 mg (XVI) vom Smp. 202—206° wurden mit 0,2 cm³ Acetanhydrid und 0,25 cm³ absolutem Pyridin im Bombenrohr 4 Stunden auf 100° erhitzt. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde ein hellgelbes Öl erhalten, das trotz langem Stehen nicht krystallisierte. Es wurde in Benzol-Pentan gelöst und durch eine mit Pentan bereitete Säule aus 0,5 g Aluminiumoxyd filtriert. Die mit Pentan, Benzol-Pentan-Mischungen und absolutem Benzol erhaltenen Eluate gaben fast keinen Eindampfrückstand. Mit Benzol-Äther-Mischungen (2 und 4% Äther) liess sich ein farbloses Öl eluieren; mit Benzol-Äther (6% und mehr bis zu absolutem Äther) wurden nur ganz kleine Mengen Öl erhalten. Die mit Benzol + 2% Äther und Benzol + 4% Äther erhaltenen Öle konnten nicht zur Krystallisation gebracht werden. Nach langem Stehen wurden sie vereinigt, im Hochvakuum bei 150° Blocktemperatur destilliert und quantitativ verseift:

5,9 ± 0,2 mg Subst.	verbrauchten 1,24 cm ³ 0,02-n. KOH
C ₂₃ H ₃₆ O ₅ (392,52)	Ber. 0,75 cm ³ 0,02-n. KOH für 1 Äquiv.
C ₂₅ H ₃₈ O ₆ (434,55)	Ber. 1,36 cm ³ 0,02-n. KOH für 2 Äquiv.
C ₂₇ H ₄₀ O ₇ (476,59)	Ber. 1,86 cm ³ 0,02-n. KOH für 3 Äquiv.

Es handelt sich demnach um ein Diacetat. Zur Isolierung des Verseifungsproduktes wurde mit Äther ausgeschüttelt und die Ätherlösung zur Entfernung von Phenolphthalein mit n. Kalilauge, dann mehrmals mit Wasser gewaschen, getrocknet und stark eingeengt. Nach Waschen mit Pentan wurden zu Büscheln vereinigte haarfeine Nadeln vom Smp. 207—208° erhalten, die mit dem reinen Hexahydro-diginigenin (XVI) gemischt ebenso schmolzen.

Farbreaktionen.

In der folgenden Tabelle sind für die Modell-Substanzen (II), (III), (IV) und (V), sowie für sämtliche Stoffe der Diginin-Reihe die Ergebnisse der Reaktion mit alkalischer Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur und der Proben nach *Raudnitz-Puluj*, *Legal* und *Zimmermann* aufgeführt.

Raudnitz-Puluj'sche Probe: 1 mg frisch sublimiertes 1,4-Dioxynaphtalin wird mit 2 Tropfen reinstem Eisessig und einer Spur konz. Salzsäure kurz erwärmt. Die Lösung soll fast farblos bleiben. Dann fügt man ca. 1 mg Substanz zu und erwärmt wieder.

Legal'sche Probe: 1—2 mg Substanz werden in 2—3 Tropfen reinstem Pyridin gelöst, mit 1 Tropfen wässriger Nitroprussidnatriumlösung versetzt und mit 1—4 Tropfen 2-n. Kalilauge vermischt.

Zimmermann'sche Probe: 1—2 mg Substanz werden in 2 Tropfen Äthanol gelöst und die Lösung mit 2 Tropfen 1-proz. alkoholischer m-Dinitrobenzol-Lösung sowie 2—3 Tropfen 5-proz. Kalilauge versetzt.

Substanz	Reduktion alk. Silber- diammin- lösung bei 20°	Raudnitz- Puluj- Probe	Legal- Probe	Zimmermann- Probe
β -Keto- α , α' -dimethyl-tetrahydrofuran (II)	sofort	+	+	carminrot
Methoxy-aceton (III)	sofort	+	+	purpurrot
ω -Methoxy-acetophenon (IV) ¹⁾	sofort	+	+	purpurrot
Cumaranon (V)	sofort ²⁾	+	+ ³⁾	purpurrot
Diginin	sofort	+	+	kirschrot
Diginigenin (VI)	sofort	+	+	purpurrot
Diginigenin-monoacetat (VII)	sofort	+	purpurrot
Diginigenin-diacetat (VIII)	sofort	-	farblos
Dihydro-diginigenin-monoacetat (XII)	sofort	+	+	carminrot
Dihydro-diginigenin-diacetat (XIII)	sofort	+	+	carminrot ⁴⁾
Tetrahydro-diginigenin (IX)	keine	-	-	farblos
Tetrahydro-diginigenin-monoacetat (X)	keine	-	schwach rosa
Tetrahydro-diginigenin-diacetat (XI)	keine	-	farblos
Hexahydro-diginigenin (XVI)	keine	-	-	farblos
Desoxo-diginigenin (II)	keine	-	-	farblos
Dihydro-desoxo-diginigenin (III)	keine	-	-	farblos
Dihydro-dehydro-desoxo-diginigenin (IV)	keine ⁵⁾	- ⁶⁾	-	schwach rosa ⁷⁾
Dihydro-desoxy-desoxo-diginigenin (V)	keine ⁵⁾	farblos
Δ^2 -Dioxy-oxo-diginen (VII)	keine	-	-	farblos
Dioxy-oxo-diginan (VIII)	keine	farblos
Dioxy-diginan (XI)	keine	-	-	farblos
Dioxo-diginan (XII)	keine	-	-	schwach rosa ⁷⁾

Die römischen Ziffern sind die in dieser Mitteilung benutzten Formelnummern.

Die kursiven römischen Ziffern beziehen sich auf die in der 3. Mitteilung gebrauchten Formelnummern.

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich (Leitung W. Manser), ausgeführt.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

¹⁾ Dieses Keton ist noch nicht beschrieben worden. Aus Methoxy-aceton und Phenylmagnesiumbromid bereitet stellt es eine hellgelbe Flüssigkeit vom Sdp. 122°/15 mm dar.

²⁾ Unter Entstehung einer roten krystallinen Verbindung.

³⁾ Beim positiven Ausfall der Legal'schen Probe wurde immer eine tiefrote Färbung beobachtet; nur hier war die Farbe königsblau.

⁴⁾ Nach kurzer Zeit.

⁶⁾ Schwach hellrosa beim Stehen.

⁵⁾ Keine Reduktion beim Erhitzen.

⁷⁾ Nach einigen Minuten.