

137. Konstitution des Sarmentogenins.

Glykoside und Aglykone, 36. Mitteilung¹⁾

von A. Katz.

(11. 2. 47.)²⁾

Für das zuerst von Jacobs und Heidelberger^{b)}³⁾ isolierte Sarmentogenin ist von Tschesche und Bohle^{a)} die Formel (I) aufgestellt worden. Das Vorliegen desselben Kohlenstoffgerüsts wie im Digitoxigenin konnte von ihnen eindeutig bewiesen werden, hingegen stützte sich die Anordnung der Hydroxylgruppen teilweise nur auf negative Ergebnisse oder auf Analogieschlüsse. Tschesche und Bohle^{a)} glaubten ferner, dass sich Sarmentogenin und Digoxigenin nur durch Raumisomerie unterschieden. Da beide Aglykone bei der Dehydrierung mit CrO₃ aber verschiedene Diketone liefern⁴⁾, nehmen sie an, dass Sarmentogenin an C-9 anomale Konfiguration besitzt.

Digoxigenin hat sich inzwischen als ein 3 α ,12 β ,14,21-Tetraoxy-norcholen-(20,22)-säure-lacton-(23 → 21) erwiesen⁵⁾⁶⁾⁷⁾. Damit entfiel die Notwendigkeit, für Sarmentogenin eine anomale Konfiguration an C-9 anzunehmen, wenn man die Hypothese von blosser Raumisomerie für die beiden Aglykone aufgibt. Die Abbaureultate von Tschesche und Bohle wären trotzdem mit der Formulierung des Sarmentogenins als einer 3,11,14-Trioxy-Verbindung vereinbar. Da Steroide mit Sauerstoff in 11-Stellung bisher nur in Nebennieren, sowie spurenweise in Harn⁸⁾⁹⁾ aufgefunden wurden, interessierte es besonders, die Konstitution des Sarmentogenins sicherzustellen. Die Bemühungen des hiesigen Institutes, die notwendigen Strophanthus-samen¹⁰⁾ zu erhalten, waren leider lange vergeblich. Vor einiger Zeit

¹⁾ 35. Mitteilung, Pharm. acta Helv. im Druck; 34. Mitteilung, Helv. **31**, 883 (1948).

²⁾ Datum der Hinterlegung als versiegeltes Schreiben; von der Redaktion auf Wunsch des Hinterlegers, Prof. Dr. T. Reichstein, Basel, am 8. IV. 48 geöffnet.

³⁾ Die mit den Buchstaben a)—d) bezeichneten Fussnoten siehe Formelseite.

⁴⁾ Diese Tatsache wurde vor kurzem bestätigt; vgl. A. Katz, T. Reichstein, Pharm. acta Helv. **19**, 231 (1944).

⁵⁾ M. Steiger, T. Reichstein, Helv. **21**, 828 (1938).

⁶⁾ W. M. Hoehn, H. L. Mason, Am. Soc. **60**, 2824 (1938).

⁷⁾ H. L. Mason, W. M. Hoehn, Am. Soc. **61**, 1614 (1939).

⁸⁾ H. L. Mason, E. J. Kepler, J. Biol. Chem. **161**, 235 (1945).

⁹⁾ H. L. Mason, J. Biol. Chem. **162**, 745 (1946).

¹⁰⁾ Es ist bis heute nicht einwandfrei abgeklärt, was für Strophanthusarten Sarmentogenin bzw. Sarmentocymarin führen und aus was für einer Varietät dieses Glykosid bisher isoliert wurde. Sowohl Jacobs und Heidelberger wie Tschesche und Bohle verwendeten Samen, die als Strophanthus hispidus bezeichneten waren, sich aber bei einer nachträglichen Kontrolle bestimmt als nicht zu dieser Art gehörig erwiesen. Nach W. A. Jacobs und A. Hoffmann, J. Biol. Chem. **79**, 531 (1928), und anderen sollen die Samen von Strophanthus hispidus kein Sarmentocymarin enthalten. Nach Jacobs und Heidelberger

gelangten wir durch die Freundlichkeit der Firma *A.G. vorm. B. Siegfried, Zofingen*¹⁾ endlich in den Besitz von 100 g „Semen Strophanthi hispidi“²⁾, aus denen in geringer Verbesserung der früher beschriebenen Methode³⁾ 405 mg kryst. Sarmentocymarin gewonnen werden konnte. Die saure Hydrolyse gab Sarmentogenin. Neben Sarmentocymarin wurde noch ein Gemisch von Glykosiden erhalten, die sich aus Wasser nicht mit Chloroform, wohl aber mit Chloroform-Alkohol (2 : 1)⁴⁾ ausschütteln liessen. Bei milder hydrolytischer Spaltung mit 0,05-n. H₂SO₄ gaben sie noch etwas Sarmentogenin. Über die daneben erhaltenen, schwer hydrolysierbaren Glykoside wurde besonders berichtet⁵⁾. Für die Untersuchung lagen 320 mg Sarmentogenin vor. Trotz dieser geringen Menge konnte die Konstitution und Konfiguration dank günstiger Umstände weitgehend ermittelt werden. Danach ist Sarmentogenin ein *3β,11α,14,21-Tetraoxy-14-iso-nor-cholen-(20,22)-säure-lacton-(23 → 21)*⁶⁾ und besitzt Formel (II). Lediglich die Stellung der tertiären HO-Gruppe ist nicht sicher bewiesen, sondern nur auf Grund von Analogien formuliert.

Acetylierung des Sarmentogenins (II) mit Acetanhydrid und Pyridin bei 18° oder bei 80° lieferte ein kryst. Diacetat III⁷⁾⁸⁾, das sehr soll bei ihrem Ausgangsmaterial wahrscheinlich *Strophanthus sarmentosus* vorgelegen haben, was für die Benennung des Glykosids massgebend war. *Tschesche* und *Bohle* haben ihr Material, so gut dies geht, ebenfalls bestimmen lassen und vermuten, dass ein Gemisch von *Strophanthus Preussii* Englet Pax und *Storphanthus Barteri* Franch. vorgelegen hat.

¹⁾ Wir möchten der genannten Firma auch hier unseren besten Dank für die Überlassung dieses Materials während der Kriegszeit aussprechen, das uns die Ausführung dieser Untersuchung ermöglichte.

²⁾ Das Samenmaterial erwies sich, soweit sich dies durch mikroskopische Untersuchung und Vergleich mit authentischem Samenmaterial⁹⁾ und den in der Literatur vorhandenen Beschreibungen¹⁰⁾¹¹⁾ entscheiden liess, als einheitlich. Es war bestimmt von *Strophanthus hispidus* verschiedenen und stimmte weitgehend mit *Strophanthus sarmentosus* überein. Ein sicherer Beweis, dass wirklich diese Art vorlag, ist damit jedoch nicht erbracht.

³⁾ *A. Katz, T. Reichstein*, Pharm. acta Helv. **19**, 231 (1944).

⁴⁾ *Vgl. A. Stoll, J. Renz, W. Kreis*, Helv. **20**, 1484 (1937).

⁵⁾ *J. Schmutz, T. Reichstein*, Pharm. acta Helv. **22**, 167 (1947).

⁶⁾ Zur sterischen Konfiguration der 11-Oxy-Gruppe vgl. *T. F. Gallagher, W. P. Long*, J. Biol. Chem. **162**, 495 (1946); *W. P. Long, T. F. Gallagher*, J. Biol. Chem. **162**, 511 (1946); *T. F. Gallagher, W. P. Long*, J. Biol. Chem. **162**, 521 (1946); *T. F. Gallagher, V. P. Hollander*, J. Biol. Chem. **162**, 533 (1946); sowie *J. v. Euw, T. Reichstein*, Helv. **30**, 205 (1947).

⁷⁾ Das schon in einer früheren Arbeit¹²⁾ amorph erhaltene Acetat konnte inzwischen krystallisiert werden.

⁸⁾ *Jacobs* und *Heidelberger*¹³⁾ beschrieben ein kryst. Dibenzoat des Sarmentocymarins vom Smp. 281° und $[\alpha]_D^{20} = +14^\circ$ (c = 1,0 in Aceton).

⁹⁾ Herr Professor *P. Casparis*, Bern, stellte uns freundlicherweise unter botanischer Kontrolle gesammelte Samen von *Strophanthus Eminii*, kombé, *sarmentosus* und *hispidus* aus der Sammlung *Mathiesen*¹¹⁾ zur Verfügung, wofür auch hier bestens gedankt sei.

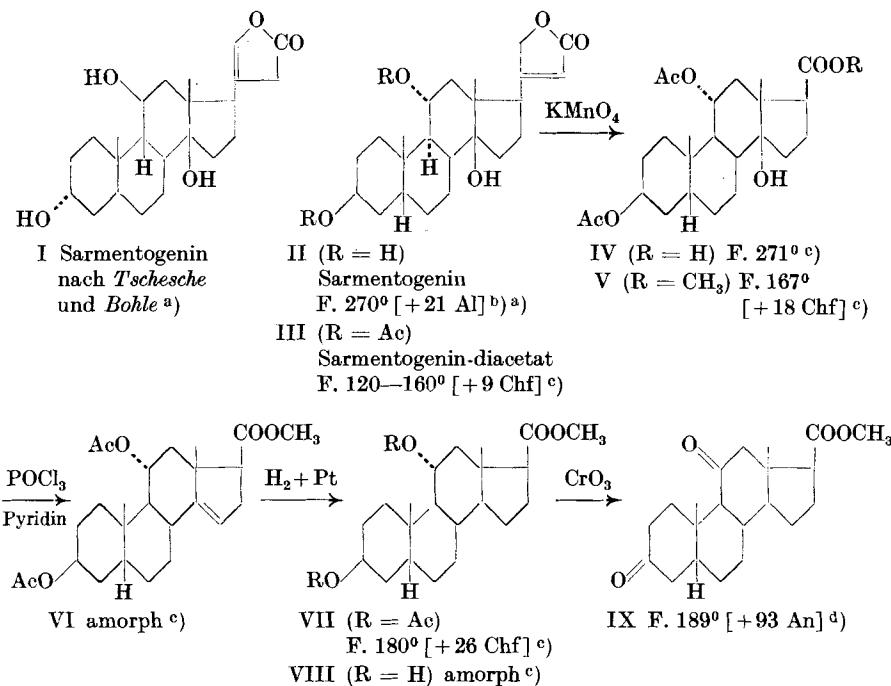
¹⁰⁾ *E. Gilg, J. Schuster*, B. **29**, 220 (1919).

¹¹⁾ *F. J. Mathiesen*, Pharm. acta Helv. **2**, 228 (1927); **3**, 21, 34 (1928).

¹²⁾ *A. Katz, T. Reichstein*, Pharm. acta Helv. **19**, 231 (1944).

¹³⁾ Weitere Literatur siehe *A. Katz, T. Reichstein*¹²⁾.

unscharf schmolz, sich aber weder durch Chromatographie noch durch fraktionierte Krystallisation in verschiedene Stoffe trennen liess. Die einzelnen bei der Chromatographie erhaltenen Fraktionen zeigten jedoch dieselbe spez. Drehung, sodass wir annehmen, dass trotz der schlechten Schmelzpunkte im wesentlichen ein einheitlicher Stoff vorgelegen hat. Zur Schonung des kostbaren Materials musste von einer Abklärung dieses eigenartigen Sachverhaltes abgesehen werden. Die alkoholische Lösung des Diacetats III zeigte im Ultraviolet selektive Absorption mit einem Maximum bei ungefähr $218 \mu\mu$ und $\log e = \text{ca. } 4.3^1)$, wie sie für α, β -ungesättigte Lactone der Digitalis- und Strophanthus-Gruppe typisch ist²⁾³⁾. Das Diacetat III war ferner gegen CrO_3 in Eisessig bei 18° beständig. Demnach besitzt Sarmentogenin 2 leicht acetylierbare und eine tertiäre HO-Gruppe.



$\text{Ac} = \text{CH}_3\text{CO}-$. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Grade auf oder abgerundete spez. Drehung in folgenden Lösungsmitteln an: An = Aceton; Al = Äthanol; Chf = Chloroform.

¹⁾ Die genaue Lage und Höhe des Maximums konnte nicht ermittelt werden.

²⁾ W. D. Paist, E. R. Blout, F. C. Uhle, R. C. Elderfield, J. Org. Chem. **6**, 273 (1941).

³⁾ Weitere Literatur siehe A. Katz, T. Reichstein⁴⁾.

⁴⁾ A. Katz, T. Reichstein, Pharm. acta Helv. **19**, 231 (1944).

^{a)} R. Tschesche, K. Bohle, B. **69**, 2497 (1936).

^{b)} W. A. Jacobs, M. Heidelberger, J. Biol. Chem. **81**, 765 (1929).

^{c)} Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

^{d)} A. Lardon, T. Reichstein, Helv. **26**, 705 (1943).

Der Abbau des Diacetats III mit KMnO_4 ¹⁾ lieferte eine kryst. Säure IV, die mit Diazomethan in den scharf schmelzenden Methylester V überging. V gab bei der Behandlung mit POCl_3 und Pyridin^{1,2)} ein amorphes Produkt VI, das mit Platinoxyd in Eisessig hydriert wurde. Dabei entstand als Hauptprodukt ein Diacetoxy-ätiocolansäure-methylester (VII) vom Smp. 180° und in Spuren ein wahrscheinlich isomerer Stoff vom Smp. 140° , der nicht weiter untersucht werden konnte. VII konnte mit keinem bisher bekannten Diacetoxy-ätiocolans- oder -allocholansäure-methylester identifiziert werden und erwies sich nach Mischprobe und Drehung auch als verschieden von dem kürzlich von *Long, Marshall* und *Gallagher*³⁾ beschriebenen $3\alpha,11\alpha$ -Diacetoxy-ätiocolansäure-methylester⁴⁾. Alkalische Verseifung und Remethylierung von VII gab einen Dioxyester VIII, der bisher nicht krystallisierte und der direkt mit CrO_3 dehydriert wurde. Der entstehende, gut krystallisierende Diketo-ester erwies sich nach Analyse, Drehung, Schmelzpunkt und Mischprobe als identisch mit $3,11$ -Diketo-ätiocolansäure-methylester (IX)⁴⁾. Da 11β -Oxy-Steroide unter den hier angewandten Bedingungen nicht acetylierbar sind, 11α -Oxy-Steroide hingegen nach *Long* und *Gallagher*⁵⁾ leicht acetyliert werden können, war die Bildung von IX nur zu erklären, wenn VII die angegebene Formel eines $3\beta,11\alpha$ -Diacetoxy-ätiocolansäure-methylesters besitzt. Dieser Stoff wurde daher teilsynthetisch aus dem $3\alpha,11\alpha$ -Diacetoxy-ätiocolansäure-methylester von *Long, Marshall* und *Gallagher*³⁾ bereitet⁶⁾. Das künstliche Produkt erwies sich nach Analyse, Drehung, Schmelzpunkt und Mischprobe als identisch mit dem aus Sarmentogenin erhaltenen Präparat VII, womit die benützten Formeln bis auf die Stellung der tertiären HO-Gruppe eindeutig bewiesen sind. Die ursprüngliche Formulierung von *Tschesche* und *Bohle* hat sich somit, wenn man von den verschiedenen Einzelheiten im räumlichen Bau absieht, als richtig erwiesen.

Tschesche und *Bohle*^{a)} haben dem Sarmentogenin 3α -Konfiguration zugeschrieben, weil es mit Digitonin nicht fällbar ist. Vor kurzem ist aber gezeigt worden, dass Digitoxigenin, das mit Digitonin ebenfalls nicht fällbar ist, 3β -Konfiguration besitzt⁷⁾. Das Verhalten gegenüber Digitonin ist somit zur Abklärung von Konstitutions-

¹⁾ Vgl. *F. Hunziker, T. Reichstein*, Helv. **28**, 1472 (1945) (frühere Literatur dagegen); *K. Meyer*, Helv. **29**, 718 (1946).

²⁾ Vgl. auch *K. Meyer*, Helv. **29**, 1908 (1946), wo Zusatz von Wasser für nötig befunden wurde.

³⁾ *W. P. Long, C. W. Marshall, T. F. Gallagher*, J. Biol. Chem. **165**, 197 (1946).

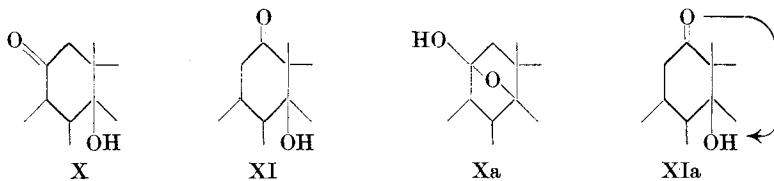
⁴⁾ Wir danken Herrn *T. F. Gallagher* bestens für die Übersendung einer Vergleichsprobe dieses Stoffes noch vor Erscheinen der erwähnten Publikation.

⁵⁾ *W. P. Long, T. F. Gallagher*, J. Biol. Chem. **162**, 511 (1946).

⁶⁾ Zusatz bei der Korrektur: *A. Katz*, Helv. **30**, 883 (1947).

⁷⁾ *F. Hunziker, T. Reichstein*, Helv. **28**, 1472 (1945).

fragen bei den digitaloiden Lactonen mit besonders grosser Vorsicht zu gebrauchen. Ausserdem wurde festgestellt, dass auch 3β -Oxy- 11α -acetoxy-ätiocolansäure-methylester mit Digitonin in 70-proz. Methanol nicht fällbar ist¹⁾. Die 11α -Acetoxylgruppe scheint somit einen grossen Einfluss auf die Fällbarkeit auszuüben. *Tschesche* und *Bohle*^{a)} haben den durch katalytische Reduktion von α_2 -Anhydro-tetrahydro-3-desoxy-sarmentogenon mit Platinoxyd in Eisessig erhaltenen Alkohol nicht mehr benzoxylieren können. Das ist heute verständlich, da die Reduktion einer 11-ständigen Ketogruppe unter diesen Bedingungen 11β -Oxy-Derivate liefert²⁾, die unter milden Bedingungen nicht acylierbar sind³⁾. Wie früher erwähnt⁴⁾, zeigen Sarmentogenon und Digoxigenon in ihren spez. Drehungen einen grösseren Unterschied, als dies sonst bei Steroiden der Fall ist, die sich nur durch die Stellung einer Ketogruppe an C-11 bzw. C-12 unterscheiden. Die abnorm grosse Differenz in den spez. Drehungen könnte natürlich dadurch bedingt sein, dass Sarmentogenon und Digoxigenon an C-14 räumlich verschieden gebaut sind. Falls dies nicht zutrifft, ist wohl in erster Linie der verschiedenen grosse Abstand der 14-ständigen HO-Gruppe von der 11- bzw. 12-ständigen Ketogruppe an der Anomalie schuld. Beim Sarmentogenon (X) liegt ein γ -Oxy-keton vor, beim Digoxigenon (XI) ein β -Oxy-keton. Die gegenseitige Beeinflussung ist also stark verschieden. Ausserdem ist beim Digoxigenon prinzipiell die Bildung eines 6-Ringes durch Wasserstoffbindung möglich (XIa), aus räumlichen Gründen allerdings nur,



wenn die tertiäre HO-Gruppe α -ständig angeordnet ist. Beim Sarmentogenon wäre prinzipiell die Entstehung einer Laktolform (Xa) möglich, bei der Reaktionsträigkeit der Ketogruppe aber wenig wahrscheinlich⁵⁾.

Ich danke Herrn Prof. *T. Reichstein* für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge. Herrn Dr. *H. Reich* danke ich für seine Hilfe bei der Abfassung des Manuskripts.

¹⁾ Zusatz bei der Korrektur: *A. Katz*, Helv. **30**, 883 (1947).

²⁾ *H. Reich*, *T. Reichstein*, Helv. **26**, 562 (1943) u. a.

³⁾ Vgl. z. B. *M. Steiger*, *T. Reichstein*, Helv. **20**, 817 (1937); *A. Lardon*, *T. Reichstein*, Helv. **26**, 586 (1943).

⁴⁾ *A. Katz*, *T. Reichstein*, Pharm. acta Helv. **19**, 231 (1944).

⁵⁾ Zusatz bei der Korrektur (27. IV. 48): Nach Privatmitteilung von Herrn Prof. *T. Reichstein* erhielt er kürzlich ein Manuskript von Herrn Dr. *W. Klyne*, London. Darin wird ausgeführt, dass der abnorm grosse Unterschied in den Drehungen der zwei Diketone durch die 14-iso-Konfiguration oder durch „vicinale Wirkung“ des ungesättigten Lacton-

Experimenteller Teil.

(Alle Schmelzpunkte sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Analyse und Drehung wurden, wenn nichts anderes angegeben, 1½—2 Stunden im Hochvakuum getrocknet. Die Temperatur ist jeweils angegeben. „Schweinchen“ bedeutet, dass die unmittelbar vor der Verbrennung im Hochvakuum getrocknete Substanz im Schweinchen eingewogen wurde.)

Isolierung von Sarmentocymarin.

95 g der im theoretischen Teil erwähnten Samen wurden gemahlen und bei 20° mit Petroläther vollständig entfettet. Das zuerst an der Luft, dann im Vakuum getrocknete Pulver (67 g) wurde mit 165 cm³ dest. Wasser angeteigt, mit 6 cm³ Toluol versetzt und zur enzymatischen Spaltung höherer Glykoside 48 Stunden bei 18° stehen gelassen. Dann wurden 165 cm³ Alkohol zugesetzt, 1 Stunde auf der Maschine geschüttelt, durch eine Schicht feinen Sand scharf abgenutscht und mit 50-proz. Alkohol nachgewaschen. Das Samenmaterial wurde noch zweimal mit je 330 cm³ 50-proz. Alkohol je 1 Stunde geschüttelt und erneut abgenutscht, worauf die bitter schmeckenden Stoffe entfernt waren. Die vereinigten, schwach sauer reagierenden Filtrate wurden mit dem feuchten, frisch aus 50 g Pb(OAc)₂, 3 H₂O mit der berechneten Menge 2-n. Natronlauge gefällt und gründlich ausgewaschenen Pb(OH)₂ versetzt und eine Stunde energisch geschüttelt. Hierauf wurde durch ein mit PbCO₃ gedichtetes Filter genutscht, mit 50-proz. Alkohol nachgewaschen und das neutrale Filtrat im Vakuum bei 35—40° Badtemperatur auf 67 cm³ eingeeengt. (Der Trockenrückstand betrug total 24 g). Das Konzentrat wurde zunächst viermal mit je 67 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. Die Auszüge passierten der Reihe nach 3 weitere Scheidetrichter mit 14 cm³ Wasser, 3 cm³ 2-n. Sodalösung und 5 cm³ Wasser, in denen sie nochmals energisch geschüttelt wurden. Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum gab 1,4 g chloroformlösliche Anteile.

Die wässrige Phase wurde anschliessend noch 7mal mit je 135 cm³ eines Gemisches von 2 Volumteilen Chloroform und 1 Volumteil Alkohol ausgeschüttelt, worauf sie noch schwach bitter war. Die Chloroform-Alkohol-Auszüge passierten der Reihe nach noch dieselben 3 Scheidetrichter wie oben, wurden dann über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 5,4 g Chloroform-Alkohol-lösliche Anteile als bräunlicher Schaum.

Die 1,4 g chloroformlöslichen Anteile wurden in 15 cm³ Methanol gelöst, mit 1,5 g *Girard's Reagens T*¹⁾ und 7,5 cm³ Eisessig versetzt und 15 Minuten unter Rückfluss leicht gekocht²⁾. Dann wurde auf —10° abgekühlt, in einem Guss mit 15 cm³ Eiswasser-Gemisch, das 95% der zur Neutralisation des Eisessigs benötigten Menge NaOH enthielt³⁾, versetzt und 3mal mit je 70 cm³ auf —10° gekühltem Chloroform ausgeschüttelt. Die mit wenig 2-n. Sodalösung und Wasser gewaschene und über Na₂SO₄ getrocknete Chloroformlösung gab beim Eindampfen im Vakuum 0,835 g aldehydfreie Anteile. Umkristallisieren aus Methanol-Äther sowie aus reinem Methanol lieferte 223 mg Sarmentocymarin in farblosen Prismen vom Smp. 125—128°, die kaum bitter schmeckten. Die Mutterlaugen (612 mg) wurden in absolutem Benzol gelöst und über 19 g alkalifreiem Al₂O₃

ringes hervorgerufen werden kann. Es wird gezeigt, dass man Werte erhält, die mit der Annahme eines Sauerstoffatoms in 11-Stellung beim Sarmentogenin gut verträglich sind, wenn man die Drehungsunterschiede zwischen Desoxo-tetrahydro-anhydro-sarmenogenon und seinen Umformungsprodukten mit den analogen Werten bei gleichen Umformungen von Gallensäuren, die eine Ketogruppe in 11-Stellung tragen, vergleicht. Es sei auch hier Herrn Dr. *Klyne* für die Zusendung seines Manuskripts vor dessen Erscheinen bestens gedankt.

¹⁾ *A. Girard, G. Sandulesco*, Helv. **19**, 1095 (1936).

²⁾ Es genügt für diesen Zweck auch 1-stündiges Stehen bei 20°. Eine vorzeitige Spaltung wird dann noch weitgehender vermieden.

³⁾ Vorher durch Titration einer abgemessenen Probe desselben Eisessigs ermittelt.

chromatographiert. Die mit Chloroform eluierbaren Anteile (250 mg) lieferten noch 182 mg reines Sarmentocymarin vom Smp. 128—131°, sowie einige Milligramm durch vorzeitige Spaltung entstandenes Sarmentogenin vom Smp. 274—280° (Verarbeitung der Mutterlaugen sowie der benachbarten nicht krystallisierenden Fraktionen der Chromatographie, zusammen 280 mg, siehe weiter unten). Totalausbeute 405 mg kryst. Sarmentocymarin.

Isolierung des Sarmentogenins (II) und Abtrennung der schwer spaltbaren Glykoside.

a) Aus kryst. Sarmentocymarin.

405 mg kryst. Sarmentocymarin wurden in 20 cm³ Methanol gelöst, mit 20 cm³ 0,1-n. H₂SO₄ versetzt, ½ Stunde unter Rückfluss gekocht und hierauf im Vakuum auf 8 cm³ eingeengt. Dabei fielen Krystalle aus, deren Abscheidung durch 2-stündiges Stehen bei 0° möglichst vervollständigt wurde. Nach Abnutschen, Waschen mit wenig Wasser und Trocknen im Vakuum schmolzen sie bei 240—270° und wogen 280 mg. Die wässrige Mutterlauge wurde 3mal mit je 20 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. Die mit wenig 2-n. Sodalösung und Wasser gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Chloroformauszüge hinterliessen beim Eindampfen im Vakuum 45 mg Rückstand. Die verbliebene wässrige Lösung wurde mit BaCO₃ neutralisiert und auf Sarmentose verarbeitet.

Die 280 mg Rohkrystalle wurden zusammen mit den 45 mg Chloroformauszug aus Methanol-Äther umkristallisiert. Es resultierten 250 mg kryst. Sarmentogenin vom Smp. 265—275° und [α]_D¹⁹ = +21,1° ± 4° (c = 0,521 in Methanol).

52,1 mg Subst. zu 10 cm³; l = 1 dm; [α]_D¹⁹ = +0,11° ± 0,02°

b) Aus Sarmentocymarin-Mutterlaugen.

Die Sarmentocymarin-Mutterlaugen sowie die amorphen Anteile der Chromatographie (zusammen 280 mg) wurden wie oben gespalten und gaben 206 mg chloroformlösliches „Genin“, das zusammen mit den unter c) erhaltenen Anteilen chromatographisch gereinigt wurde.

c) Spaltung der Chloroform-Alkohol-löslichen Glykoside.

Die 5,4 g Chloroform-Alkohol-löslichen Glykoside wurden in 130 cm³ Methanol gelöst, mit 130 cm³ 0,1-n. H₂SO₄ versetzt, ½ Stunde unter Rückfluss gekocht und im Vakuum auf 80 cm³ eingeengt. Die Lösung wurde zunächst 6mal mit je 80 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. Die Auszüge passierten wieder 3 Scheidetrichter mit 10 cm³ Wasser, 3 cm³ 2-n. Sodalösung und 5 cm³ Wasser, wurden über Na₂SO₄ getrocknet und hinterliessen beim Eindampfen im Vakuum 450 mg Rückstand (vgl. weiter unten).

Die schwefelsauren wässrigen Anteile wurden hierauf mit BaCO₃ soweit neutralisiert, dass sie nicht mehr kongosauer waren, durch Zentrifugieren von BaSO₄ befreit, im Vakuum auf 30 cm³ eingeengt und 5mal mit je 200 cm³ Chloroform-Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge passierten die oben erwähnten 3 Scheidetrichter, wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (= „schwer spaltbare Glykoside“¹⁾) wog 4,1 g.

Die 450 mg chloroformlöslichen Anteile wurden wie oben mit Girard's Reagens behandelt und gaben 290 mg aldehydfreies Produkt. Dieses wurde mit den bei der Spaltung b) erhaltenen 206 mg chloroformlöslichen Genin vereinigt und das Ganze (496 mg) mit 15 g alkalifreiem Al₂O₃ nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Die mit Benzol-Chloroform (1:3) eluierbaren Anteile gaben noch 70 mg kryst. Sarmentogenin vom Smp. 270—275°. Totalausbeute 320 mg.

Sarmentogenin-diacetat (III).

320 mg Sarmentogenin (II) wurden in 6 cm³ absolutem Pyridin gelöst, mit 6 cm³ Acetanhydrid versetzt und 48 Stunden bei 18° stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum

¹⁾ Zusatz bei der Korrektur: Untersuchung dieses Teils siehe J. Schmutz, T. Reichstein, Pharm. acta Helv. 22, 167 (1947).

eingedampft, der Rückstand in Äther gelöst, die Lösung mit 2-n. Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (384 mg) gab aus absolutem Äther 380 mg farblose Nadeln vom Smp. 130—155°; nach starkem Verreiben Smp. 125—135°, der auch nach wiederholtem Umkristallisieren nicht schärfer wurde.

3,800 mg Subst. gaben 9,498 mg CO_2 und 2,702 mg H_2O (Trocknung bei 100°, Schweinchen)



Gef. „, 68,21 „, 7,96%

Das U.V. Absorptionsspektrum ist im theoretischen Teil erwähnt.

Zur Prüfung auf Einheitlichkeit wurde die ganze Menge, inkl. Mutterlaugen, an 15 g alkalifreiem Al_2O_3 nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Zum Nachwaschen dienten je 30 cm³ Lösungsmittel. Jede Fraktion wurde für sich eingedampft und eine grössere Anzahl der Rückstände einmal aus Äther kristallisiert. Über das Ergebnis orientiert folgende Tabelle:

Fraktionsnummer	Elutionsmittel	Smp. der erhaltenen Krystalle
1—2	Benzol-Petroläther 1 : 1	—
3	„ „ 3 : 1	—
4—5	Benzol	—
6	Benzol-Chloroform 9 : 1	—
7	„ „ 9 : 1	130—150°
8	„ „ 9 : 1	140—160°
9	„ „ 9 : 1	130—140°
10	„ „ 9 : 1	130—150°
11—12	„ „ 9 : 1	—
13	„ „ 9 : 1	135—155°
14	„ „ 9 : 1	—
15	„ „ 9 : 1	135—155°
16	„ „ 9 : 1	—
17	„ „ 9 : 1	135—155°
18	„ „ 9 : 1	—
19	„ „ 8 : 2	130—150°
20	„ „ 8 : 2	130—150°
21	„ „ 8 : 2	—
22—27	„ „ 1 : 1	—
28	„ „ 1 : 1	140—160°
29	„ „ 1 : 1	140—160°
30	„ „ 1 : 1	—
31	Chloroform	135—155°
32	„	Spur schmierig
33—34	„	—
35	Methanol	—

Die in der Tabelle angegebenen Schmelzpunkte gelten für die unter dem Deckglas leicht zerdrückten Krystalle. Fein verriebene Proben schmolzen tiefer, z. B. 125—135° (Fr. 8), 120—133° (Fr. 31). Verschiedenste Mischproben gaben keine Depression. Die unzerdrückten Krystalle schmolzen höher, z. B. 148—165° (Fr. 8), 154—160° (Fr. 31).

Zur Bestimmung der Drehung wurden die Fraktionen 9—12 vereinigt, aus Äther umkristallisiert und 1 Stunde im Hochvakuum bei 80° getrocknet. Die Fraktionen

24—26 sowie die Fraktion 31 wurden ebenso behandelt. Die 3 Proben zeigten folgende Schmelzpunkte und spez. Drehungen:

Fr. 9—12: Smp. 130—150°; $[\alpha]_D^{20} = +9,4^0 \pm 2^0$ ($c = 1,007$ in Chloroform)

10,150 mg Subst. zu 1,0094 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{20} = +0,095^0 \pm 0,02^0$

Fr. 24—26: Smp. 130—150°; $[\alpha]_D^{20} = +9,4^0 \pm 2^0$ ($c = 1,065$ in Chloroform)

10,750 mg Subst. zu 1,0094 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{20} = +0,10^0 \pm 0,02^0$

Fr. 31: Smp. 135—155°; $[\alpha]_D^{21} = +9,3^0 \pm 2^0$ ($c = 0,965$ in Chloroform)

9,740 mg Subst. zu 1,0094 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{21} = +0,09^0 \pm 0,02^0$

Da eine Trennung in schärfer schmelzende Anteile nicht gelang und da die spez. Drehungen aller Fraktionen gleich waren, wurde für die weitere Verarbeitung das ganze Material wieder vereinigt.

Eine Probe wurde in Pyridin-Acetanhydrid 2 Stunden bei 80° nachacetyliert, doch wurden die Eigenschaften dadurch nicht verändert.

Oxydationsversuch. 30 mg Sarmentogenin-diacetat (III) wurden in 0,5 cm³ Eisessig gelöst, mit 0,35 cm³ 2-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung versetzt und 16 Stunden bei 18° stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum bei 20° eingedampft, der Rückstand mit etwas Wasser versetzt und mit viel Äther ausgeschüttelt. Die mit verdünnter H₂SO₄, Sodalösung und Wasser gewaschene und über Na₂SO₄ getrocknete Ätherlösung gab beim Eindampfen ca. 28 mg Rückstand. Aus wenig Äther Krystalle vom Smp. 130—150°; Mischprobe mit dem Ausgangsmaterial (III) ebenso.

3β, 11α-Diacetoxy-14-oxy-ätiocolansäure (IV).

100 mg Sarmentogenin-diacetat (III) (Rohprodukt) wurden in 6 cm³ Aceton¹⁾ gelöst, mit 100 mg fein gepulvertem KMnO₄ versetzt und bis zur Entfärbung (1 $\frac{3}{4}$ Stunden) auf der Maschine geschüttelt. Dann wurde im Vakuum bei 20° Badtemperatur eingedampft, der Rückstand mit 2-n. H₂SO₄ bis zur eben kongosauren Reaktion versetzt und 3mal mit Chloroform-Äther ausgeschüttelt. Die im Vakuum etwas eingeengten Chloroform-Äther-Auszüge wurden 5mal mit kleinen Portionen kalter n. Sodalösung ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Nach Trocknen im Vakuum verblieben 48 mg Neutralsubstanz. Die oben erwähnten Sodaauszüge wurden sofort mit HCl bis zur eben kongosauren Reaktion versetzt und zweimal mit Chloroform-Äther ausgeschüttelt. Die mit wenig Wasser gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge hinterliessen beim Eindampfen im Vakuum 39 mg rohe Säure.

Ein zweiter Ansatz mit 270 mg Sarmentogenin-diacetat (III) gab 104 mg rohe Säure und 125 mg Neutralteil. Die beiden Neutralteile (zusammen 173 mg) wurden nochmals oxydiert und lieferten noch 54 mg rohe Säure und 58 mg Neutrales. (Bei diesem Versuch ging ca. 1/3 durch einen Unfall verloren).

Die vereinigten rohen Säuren (180 mg) wurden zuerst aus Aceton-Äther, dann 2mal aus Aceton umkrystallisiert und gaben 34 mg reine Säure IV in Form farbloser, recht-eckiger Blättchen vom Smp. 271—273°. Aus den Mutterlaugen wurden noch 50 mg weniger gut schmelzende Krystalle erhalten.

3β, 11α-Diacetoxy-14-oxy-ätiocolansäure-methylester (V).

34 mg 3β, 11α-Diacetoxy-14-oxy-ätiocolansäure (IV) vom Smp. 271—273° wurden in Äther suspendiert und mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt, worauf die Krystalle langsam in Lösung gingen. Nach kurzem Stehen wurde eingedampft. Der Rückstand gab aus wenig Äther Krystalldrusen, die nach Waschen mit Äther-Petroläther zunächst bei 107—111° schmolzen. Nach 5-tägigem Aufbewahren schmolz der Ester bei 150—152°, worauf die Schmelze sofort wieder erstarnte, um definitiv bei 166—167° zu schmelzen.

¹⁾ Das verwendete Aceton wurde vorher zweimal über KMnO₄ destilliert.

50 mg krystallisierte, weniger reine Säure IV wurden analog methyliert und der rohe Methylester an 1,5 g alkalischem Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Äther-Petroläther, Benzol und Benzol-Äther (1:1) eluierten Anteile gaben noch gut krystallisierenden Methylester vom Smp. 165—168°.

Sämtliche krystallinen Methylesterfraktionen wurden vereinigt und aus Äther-Petroläther umkrystallisiert. Es resultierten 49 mg Krystalle vom Smp. 165—168°; $[\alpha]_D^{15} = +18,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,9886$ in Chloroform).

9,978 mg Subst. (Trocknung bei 70°) zu 1,0094 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{15} = +0,18^\circ \pm 0,02^\circ$

Zur Analyse wurde im Hochvakuum sublimiert, aus Äther umkrystallisiert und 4 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet. Smp. 167—168°.

3,670 mg Subst. gaben 8,964 mg CO_2 und 2,819 mg H_2O

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_7$ (450,54) Ber. C 66,64 H 8,50%

Gef. „ 66,66 „ 8,59%

Roher $3\beta,11\alpha$ -Diacetoxy-ätiocholen-(14)-säure-methylester (VI).

41 mg $3\beta,11\alpha$ -Diacetoxy-14-oxy-14-iso-ätiolahansäure-methylester (V) vom Smp. 165 bis 168° wurden in 0,49 cm³ absolutem Pyridin gelöst und mit 0,12 cm³ POCl_3 versetzt. Nach 24ständigem Stehen bei 20° wurde etwas Eis zugegeben und dreimal mit Äther ausschüttelt. Die mit 2-n. Salzsäure, 2-n. Sodalösung und Wasser gewaschene und über Na_2SO_4 getrocknete Ätherlösung hinterliess beim Eindampfen 38 mg amorphen Rückstand. Er wurde im Molekularkolben im Hochvakuum destilliert. Bei 110—120° Badtemperatur destillierten 31 mg, bei 135—140° die restlichen 7 mg Substanz.

$3\beta,11\alpha$ -Diacetoxy-ätiolahansäure-methylester (VII) und nicht identifiziertes Isomeres.

Der bei 110—120° destillierte ungesättigte Methylester VI (31 mg) wurde mit 17 mg PtO_2 , H_2O in 2 cm³ Eisessig hydriert. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme (ca. 1 Stunde) wurde filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand gab bei fraktionierter Krystallisation aus Äther 2 Substanzen. Die schwerer lösliche sinterte bei 160° und schmolz bei 178—182°. Die leichter lösliche schmolz bei 138—141°.

Die bei 135—140° destillierten Anteile des Methylesters VI (7 mg) wurden ebenso hydriert. Es resultierten nur Krystalle vom Smp. 178—182° (Sintern bei 160°).

Sämtliche bei 178—182° schmelzende Krystalle wurden vereinigt (17 mg) und an 500 mg alkalischem Al_2O_3 chromatographiert. Die Substanz wurde mit Petroläther-Benzol (9:1), (8:2), (7:3), (1:1) und mit absolutem Benzol eluiert. Alle Eluate schmolzen nach Umkrystallisieren aus Äther bei 179—182° (Sintern bei 170°); der Mischschmelzpunkt der ersten und letzten Fraktion war gleich. Daher wurden alle Eluate wieder vereinigt (17 mg), im Molekularkolben bei 0,01 mm und 130—145° sublimiert, aus Äther umkrystallisiert und mit Äther-Petroläther gewaschen. Farblose quadratische oder hexagonale Plättchen, manchmal auch Gebilde, die in der Aufsicht folgende Form hatten:

◇ ; Smp. 179—183° (Sintern bei 178°);

$[\alpha]_D^{17} = +25,7^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,895$ in Chloroform).

8,846 mg Subst. (Trocknung bei 90°) zu 0,9971 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{17} = +0,23^\circ \pm 0,02^\circ$

3,820 mg Subst. gaben 9,694 mg CO_2 und 8,95 mg H_2O (Trocknung 4 Stunden bei 90°, Schweinchen)

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (434,54) Ber. C 69,09 H 8,81%

Gef. „ 69,25 „ 8,95%

Eine Probe $3\alpha,11\alpha$ -Diacetoxy-ätiolahansäure-methylester von Long, Marshall und Gallagher¹⁾ schmolz unter den von uns benützten Bedingungen bei 171—173° und besass nach Literatur¹⁾ die spez. Drehung $[\alpha]_D^{23} = +46,3^\circ$ (Chloroform). Die Mischprobe schmolz

¹⁾ W. P. Long, C. W. Marshall, T. F. Gallagher, J. Biol. Chem. 165, 197 (1946), fanden Smp. 169,5—171°.

bei 148—168°. Die beiden Präparate waren somit sicher verschieden. Teilsynthetisch hergestellter $3\beta,11\alpha$ -Diacetoxy-ätiocolansäure-methylester¹⁾ schmolz bei 182—184° (Sintern bei 180°) und zeigte die spez. Drehung $[\alpha]_D^{15} = +26,5^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,981$ in Chloroform). Die Mischprobe mit dem aus Sarmentogenin erhaltenen (VII) schmolz bei 182—183,5° (leichtes Sintern bei 175°).

Die Mutterlaugen der obigen Krystalle wurden vereinigt (zusammen 10 mg) und an 0,3 g alkalifreiem Al_2O_3 chromatographiert. Zum Nachwaschen dienten je 4 cm³ der in der folgenden Tabelle genannten Lösungsmittel.

Fraktionsnummer	Eluierungsmittel	Eindampfungsrückstand
1	Petroläther-Benzol 95 : 5 . . .	Spur ölig
2	" " 9 : 1 . . .	" "
3	" " 9 : 1 . . .	" "
4—6	" " 8 : 2 . . .	1—2 mg Smp. 140—145°
7—8	" " 1 : 1 . . .	1—2 mg Smp. 170—178°
9	" " 1 : 3 . . .	(sintern bei 160°)
10	abs. Benzol	Spur ölig
11	Chloroform-Methanol 9 : 1 . .	" "

Die Fraktionen 4—6 (zusammen 1—2 mg) wurden aus Äther krystallisiert; Smp. 140 bis 145°. Dieses Material wurde mit den oben erwähnten, direkt erhaltenen Krystallen vom Smp. 138—141° vereinigt. Aus Äther wurden 3 mg farblose Krystalle erhalten. Zur Analyse wurde im Hochvakuum sublimiert.

2,134 mg Subst. gaben 5,399 mg CO_2 und 1,692 mg H_2O
 $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (434,54) Ber. C 69,09 H 8,81%
Gef. „, 69,04 „, 8,88%

3,11-Diketo-ätiocolansäure-methylester (IX) aus VII.

11 mg aus Sarmentogenin gewonnener $3\beta,11\alpha$ -Diacetoxy-ätiocolansäure-methylester (VII) vom Smp. 179—182° wurden in 0,3 cm³ Methanol gelöst, mit 22 mg 50-proz. KOH versetzt und 48 Stunden bei 37—40° stehen gelassen. Nach Zusatz von 1 cm³ Wasser wurde das Methanol im Vakuum entfernt, der Rückstand mit HCl bis zur kongosauren Reaktion versetzt und 3mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit wenig Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Chloroformlösungen wurden im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther gelöst und mit überschüssiger ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach 10 Minuten wurde eingedampft. Es resultierten 9 mg roher Ester VIII, der nicht krystallisierte.

Er wurde in 2 cm³ reinstem Eisessig gelöst, mit 0,25 cm³ 2-proz. CrO_3 -Eisessig-Lösung (= 5 mg CrO_3) versetzt und 4 Stunden bei 18° stehen gelassen, worauf die Chromsäure noch nicht völlig verbraucht war. Es wurde im Vakuum bei 20° eingeengt, mit Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die mit 2-n. H_2SO_4 , 2-n. Sodalösung und Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrocknete Ätherlösung hinterliess beim Eindampfen 6 mg Rückstand. Aus Äther-Petroläther, dann aus wenig Äther umkrystallisiert resultierten 3 mg farblose, zu Drusen vereinigte Nadeln, Smp. 186—188° (Sintern ab 182°). Die spez. Drehung betrug $[\alpha]_D^{17} = +97,5^\circ \pm 7^\circ$ ($c = 0,285$ in Aceton).

2,963 mg Subst. (Trocknung 1 St. bei 70°) zu 1,0141 cm³; $l = 1 \text{ dm}$; $[\alpha]_D^{17} = +0,285^\circ \pm 0,02^\circ$

¹⁾ Zusatz bei der Korrektur: A. Katz, Helv. 30, 883 (1947).

Authentischer 3,11-Diketo-ätiocolansäure-methylester^{d)} schmolz nach starkem Verreiben bei 187—189° (Sintern ab 185°). Er zeigt nach Lit. ^{d)} die spez. Drehung von $[\alpha]_D^{16} = +92,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,250$ in Aceton). Die Mischprobe schmolz bei 186—188° (Sintern bei 183°).

Die Mikroanalysen und die Aufnahme des Ultraviolet-Absorptionsspektrums wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich (Leitung W. Manser) ausgeführt.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Sarmentogenin wurde zu $3\beta,11\alpha$ -Diacetoxy-ätiocolansäure-methylester abgebaut, wodurch die Konstitution und Konfiguration bis auf die Stellung der tertiären HO-Gruppe bewiesen wurde.

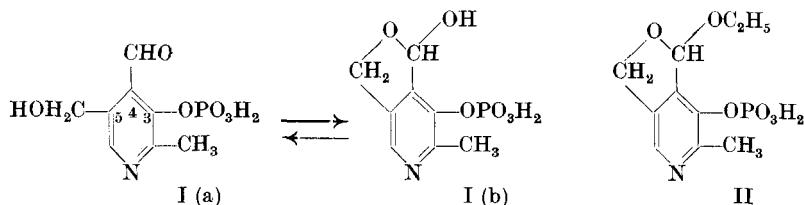
Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

138. Pyridoxal-3-phosphat als Coferment der L-Aminosäure-decarboxylase

von P. Karrer, M. Viscontini und O. Forster.

(14. IV. 48.)

J. C. Gunsalus und W. W. Umbreit haben kürzlich¹⁾ die Ansicht ausgesprochen, dass Pyridoxal-3-phosphat (I), welches wir als Acetal (II) in reiner krystallisierter Form synthetisiert hatten²⁾, mit dem Coferment der L-Aminosäuredcarboxylase, der Codecarboxylase, nicht identisch ist.



Wir sind daher genötigt, diese ganze Frage etwas eingehender zu diskutieren.

1. Die Konstitution der Codecarboxylase.

Dass das Coferment der L-Tyrosin-decarboxylase ein Pyridoxal-phosphorsäureester ist, ergibt sich mit grösster Wahrscheinlichkeit aus der Tatsache, dass eine Mischung von Pyridoxal und Adenosintriphosphat (A.T.P.) diese Cofermentwirkung besitzt, während Pyri-

¹⁾ J. C. Gunsalus, W. W. Umbreit, J. Biol. Chem. **170**, 415 (1947).

²⁾ P. Karrer, M. Viscontini, Helv. **30**, 52, 524 (1947).