

## REFERENCES

- [1] Communication 15: *R. Schwwyzer, Aung Tun-Kyi, M. Caviezel & P. Moser*, Helv. 53, 15 (1970); 16: *K. Wüthrich, J. P. Meraldi, A. Tun-Kyi & R. Schwwyzer*, First European Biophysics Congress E1/20, p. 93, Verlag der Wiener Medizinischen Akademie 1971; 17: *U. Ludescher & R. Schwwyzer*, Helv. 54, 1637 (1971); 18: *B. Donzel, B. Kamber, K. Wüthrich & R. Schwwyzer*, Helv. 55, 947 (1972); 19: *J. P. Meraldi, R. Schwwyzer, A. Tun-Kyi & K. Wüthrich*, Helv. 55, 1962 (1972); 20: *K. Wüthrich, A. Tun-Kyi & R. Schwwyzer*, FEBS Letters 25, 104 (1972); 21: *U. Ludescher & R. Schwwyzer*, Helv. 55, 2052 (1972).
- [2] *R. Schwwyzer & U. Ludescher*, Helv. 52, 2033 (1969).
- [3] *R. Schwwyzer, J. P. Carrión, B. Gorup, H. Nolting & Aung Tun-Kyi*, Helv. 47, 441 (1964).
- [4] *C. M. Deber, D. A. Torchia & E. R. Blout*, J. Amer. chem. Soc. 93, 4893 (1971).
- [5] *J. T. Edsall, P. J. Flory, J. C. Kendrew, A. M. Liquori, G. Némethy, G. N. Ramachandran & H. A. Scheraga*, J. mol. Biol. 15, 309 (1966).
- [6] *IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature*, J. mol. Biol. 52, 1 (1970).

255. Weitere Bufadienolide aus *Ch'an Su*Über Krötengifte, 39. Mitteilung<sup>1)</sup>von **Niklaus Höriger, Dobrila Živanov, Horst H. A. Linde**  
und **Kuno Meyer**

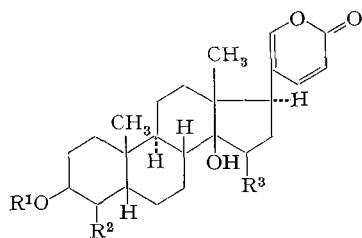
Pharmazeutisches Institut der Universität Basel

(28. VIII. 72)

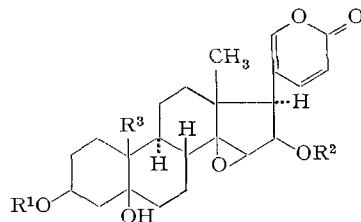
*Summary.* From the toad venom *Ch'an Su* the bufadienolides **1**, **4**, **9**, **10**, **12**, **15**, **17**, **20**, **22**, **25** and **18**, the latter as diacetate **19** were isolated and their structure elucidated.

In Fortsetzung unserer Versuche [2], die chloroformlöslichen Bestandteile von *Ch'an Su* aufzutrennen, liess sich eine Reihe weiterer Bufogenine isolieren, die grösstenteils bisher unbekannt waren. Sie wurden durch wiederholte chromatographische Auftrennungen von Mutterlaugenrückständen (ML.) [2] gewonnen, die bei der Kristallisation bereits früher in *Ch'an Su* aufgefunderer Bufogenine erhalten worden waren. So konnten aus den ML. von Cinobufagin [3] und Resibufogenin [4] die Substanzen **1** und **4** und aus der ML. von Bufalin [5] Bufotalon (**9**) [6], das bisher nur im Giftsekret von *Bufo formosus Boulenger* aufgefunden worden war [7], gewonnen werden. **10**, **12** und **22** liessen sich aus den polaren u.a. noch Desacetylcinobufotalin [8] enthaltenden Anteilen der ersten säulenchromatographischen Auftrennungen der Chloroformextrakte aus *Ch'an Su* isolieren [2]. **15** sowie **20** wurden aus den ML. von Arenobufagin [9] gewonnen, wobei für die Lokalisierung von **15** im DC. und seine Isolierung das durch Reduktion von **13** mit  $\text{NaBH}_4$  erhaltene **15** diente<sup>2)</sup>. Mangels Substanz konnte die Diacetylverbindung **16** nicht aus natürlichem **15** bereitet werden, dagegen durch Acetylierung der ML. von **25** (siehe weiter unten), das man durch Reduktion von rohem **13** erhalten hatte. Das rohe Acetylierungsprodukt gab im DC. 2 Flecke.

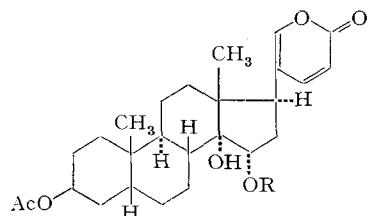
<sup>1)</sup> 38. Mitt.: s. [1].<sup>2)</sup> Da Cinobufaginol (**23**) [10], den dem 19-Oxo-cinobufagin (**27**) [2] entsprechende Alkohol, schon früher in *Ch'an Su* aufgefunden worden war, vermuteten wir, dass die dem 19-Oxo-cinobufotalin (**13**) [2] entsprechende 19-Hydroxyverbindung **15** auch in *Ch'an Su* enthalten sei.



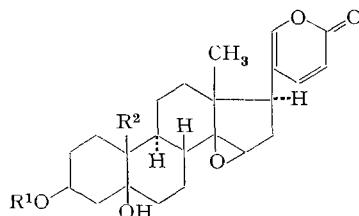
- 1  $R^1 = H$   $R^2 = OH$   $R^3 = H$   
 2  $R^1 = Ac$   $R^2 = OH$   $R^3 = H$   
 3  $R^1 = Ac$   $R^2 = OAc$   $R^3 = H$   
 4  $R^1 =$   $R^2 = H$   $R^3 = OH$   
 5  $R^1 = Ac$   $R^2 = H$   $R^3 = OH$   
 6  $R^1 = Ac$   $R^2 = H$   $R^3 = OAc$



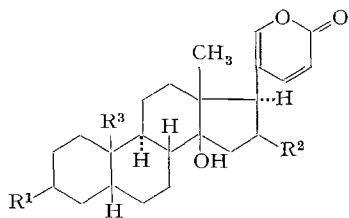
- 12  $R^1 =$   $R^2 = H$   $R^3 = CHO$   
 13  $R^1 = H$   $R^2 = Ac$   $R^3 = CHO$   
 (19-Oxo-cinobufotalin [2])  
 14  $R^1 =$   $R^2 = Ac$   $R^3 = CHO$   
 15  $R^1 = H$   $R^2 = Ac$   $R^3 = CH_2OH$   
 16  $R^1 =$   $R^2 = Ac$   $R^3 = CH_2OAc$



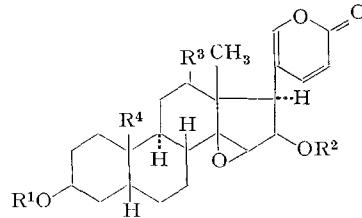
- 7  $R = H$   
 8  $R = Ac$



- 17  $R^1 = H$   $R^2 = CHO$   
 (Bufotalinin [7])  
 18  $R^1 = H$   $R^2 = CH_2OH$  (nicht isoliert)  
 19  $R^1 = Ac$   $R^2 = CH_2OAc$



- 9  $R^1 = O =$   $R^2 = OAc$   $R^3 = CH_3$   
 (Bufotalon [6])  
 10  $R^1 = OH$   $R^2 = H$   $R^3 = CH_2OH$   
 11  $R^1 = OAc$   $R^2 = H$   $R^3 = CH_2OAc$



- 20  $R^1 = H$   $R^2 = Ac$   $R^3 = OH$   
 $R^4 = CH_3$   
 21  $R^1 =$   $R^2 = Ac$   $R^3 = OAc$   
 $R^4 = CH_3$   
 22  $R^1 =$   $R^2 =$   $R^3 = H$   
 $R^4 = CH_2OH$   
 23  $R^1 = H$   $R^2 = Ac$   $R^3 = H$   
 $R^4 = CH_2OH$  (Cinobufaginol [10])  
 24  $R^1 =$   $R^2 = Ac$   $R^3 = H$   
 $R^4 = CH_2OAc$   
 25  $R^1 = H$   $R^2 = Ac$   $R^3 = H$   
 $R^4 = OH$   
 26  $R^1 =$   $R^2 = Ac$   $R^3 = H$   
 $R^4 = OH$   
 27  $R^1 = H$   $R^2 = Ac$   $R^3 = H$   
 $R^4 = CHO$   
 (19-Oxo-cinobufagin [2])  
 28  $R^1 =$   $R^2 = Ac$   $R^3 = H$   
 $R^4 = CHO$

Ac =  $CH_3-CO-$

Die schwächer polare Substanz stellte das gesuchte **16** dar, während der polarerer die Formel **19** zukommt. Diesem Ester liegt die 19-Hydroxy-Verbindung **18** des Bufotalinins (**17**) [11] zugrunde, das ebenfalls isoliert und damit zum ersten Mal in *Ch'an Su* nachgewiesen werden konnte. **25** wurde durch wiederholte chromatographische Auf trennung von polaren Substanzgemischen gewonnen, die bei der Chromatographie von Bufalin, Cinobufotalin [12] und Bufotalin [6] enthaltenden ML. angefallen waren (siehe exp. Teil).

*Strukturmöglichkeiten.* Alle oben erwähnten Substanzen gaben im UV. die für Bufadienolide typische Absorption zwischen 294–300 nm ( $\epsilon = 4500$ –5400) und zeigten im IR. Banden bei etwa 1720, 1630 und 1535  $\text{cm}^{-1}$ . Die NMR.-, MS.-Daten und die Schmelzpunkte sind in den Tab. 1 und 2 zusammengefasst. Das MS.-Spektrum der Substanz **1** ergab die Summenformel  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5 = 402$ , d. h., man kann für **1** ein normales Steroidgerüst annehmen, das noch das Pyron in Stellung  $17\beta$  sowie drei Hydroxylgruppen trägt. Zwei davon sind aus Analogiegründen mit grosser Sicherheit an C(3) und C(14) zu setzen, da man bisher bei keinem Bufadienolid, sei es tierischer oder pflanzlicher Herkunft, C-Atome ohne sauerstoffhaltige Substituenten an diesen Stellen gefunden hat [13]. Während man für C(14)  $\beta$ -Konfiguration annehmen darf [13], kennt man neben überwiegend *cis*- $\beta$ -Verknüpfung der Ringe A und B auch die *trans*-Verbindungen mit einem  $5\alpha$ -Wasserstoffatom [13]. Aus dem NMR.-Spektrum der Diacetylverbindung **3** kann man schliessen, dass der Substituent an C(3) axiale Lage einnimmt. Das entsprechende C(H)-Signal, ein Multiplett bei etwa 5,1 ppm, besitzt eine BH von etwa 6 Hz. Vereinbar damit ist entweder die normale  $3\beta,5\beta$ - oder die anomale  $3\alpha,5\alpha$ -Konfiguration. Da das Kernresonanzsignal des C(H) der anderen O-Acetylgruppe aus vier gleich grossen Linien mit Aufspaltungen von 2,5 und 7,5 Hz (zentriert bei 4,88 ppm) besteht, tragen die Nachbarkohlenstoffatome total nur zwei Wasserstoffatome, von denen das eine aufgrund der Aufspaltungen äquatoriale, das andere axiale Lage zum äquatorialen Substituenten einnehmen sollte. Nach den «Zürcher-Tabellen» [14], und nach [15] genügt beiden Kriterien, d. h. Verschiebung der Methylgruppen und Aufspaltung des festzulegenden sekundären Alkohols, keiner der tabellierten Werte. *Per exclusionem* bleiben für die A-B-*cis*-verknüpfte Verbindung die  $1\alpha$ - und  $4\beta$ -, für die A-B-*trans*-verknüpfte die  $1\beta$ - und  $4\alpha$ -Stellungen übrig. Der gefundene Beitrag der festzulegenden Acetoxygruppe zur chemischen Verschiebung der Methylgruppen in der *trans*-verknüpften Verbindung (jeweils zwei Werte, da C(18)- und C(19)-Methylgruppenverschiebung nicht bestimmt!) ist aber mit 0,25 bzw. 0,32 ppm und in der einen der beiden A-B-*cis*-verknüpften mit 0,33 ppm derart gross, dass er nur von einer 1,3-diaxialen Lage von Methylgruppe und Substituent herühren kann. Die *trans*-Verknüpfung der Ringe A und B ist daher auszuschliessen. Zusätzlich oxydierten wir **1** zum Diketon: das nach DC. einheitliche Rohprodukt besass ein UV.-Maximum bei 286 nm ( $\epsilon \approx 12000$ ) und ist sowohl mit einem enolisierten 1,3- als auch mit einem 1,2-Diketon vereinbar, die Verschiebung des Maximums in alkalischem Milieu nach 359 nm ( $\epsilon \approx 12000$ ) dagegen nur mit einem 1,2-Diketon [16]. Es handelt sich also bei der untersuchten Substanz um  $3\beta,4\beta,14$ -Trihydroxy- $5\beta,14\beta$ -bufadienolid (**1**). – Die Struktur von **4** und die ihrer Acetylverbindungen **5** und **6** wurde durch Partialsynthese ermittelt: Hydroxylierung von 3-O-Acetyl-14,15-anhydro-bufalin [17] mit  $\text{OsO}_4$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  [18] gab neben dem gesuchten **4** bzw. den Acetyl derivaten **5** und **6** zur Hauptsache den isomeren vicinalen Alkohol **7**. Zum

Tabelle 1. Protonenresonanzsignale bei 60 MHz (2, 3, 5, 6, 21 bei 100 MHz<sup>3</sup>) aufgenommen in (Tetramethylsilan)

	C(23)–H	C(22)–H	C(21)–H	C(19)–3 H	C(18)–3 H	3 $\alpha$ H	3 $\beta$ –Ac
<b>1</b>	6,27 <i>d</i> (11)	7,20	7,37	1,02 <i>s</i>	0,86 <i>s</i>	4,11 <i>b s</i> BH 8	
<b>2</b>				1,03 <i>s</i>	0,85 <i>s</i>	5,07 <i>b s</i> BH 7	2,03 <i>s</i>
<b>3</b>	6,28 <i>d</i> (10,5)	7,15–7,30		1,04 <i>s</i>	0,81 <i>s</i>	5,10 <i>b s</i> BH 6,5	2,05 <i>s</i> bzw. 2,08
<b>4</b>	6,27 <i>d</i> (9,5)	7,60 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,23	0,91 <i>s</i>	0,70 <i>s</i>	4,12 <i>b s</i>	
<b>5</b>				0,92 <i>s</i>	0,71 <i>s</i>	5,07 <i>b s</i> BH 7	2,05 <i>s</i>
<b>6</b>	6,28 <i>d</i> (9,5)	7,59 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,22	0,93 <i>s</i>	0,74 <i>s</i>	5,07 <i>b s</i>	2,05 <i>s</i> bzw. 2,09
<b>7</b>	6,19 <i>d</i> (9,5)	7,91 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,28 « <i>d</i> » (2,5)	0,94 <i>s</i>	0,72 <i>s</i>	5,01 <i>b s</i> BH $\approx$ 8	2,02 <i>s</i>
<b>8</b>		$\approx$ 7,2	$\approx$ 7,2	1,00 <i>s</i>	0,72 <i>s</i>	$\approx$ 5,1	2,06 <i>s</i> bzw. 2,11
<b>9</b>	6,17 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 1)	7,99 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,22	1,02 <i>s</i> [1,017]	0,82 <i>s</i> [0,824]		
<b>10</b>	6,30 <i>d</i> (9,5)	7,97 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,52 « <i>d</i> » (2,5)		0,60 <i>s</i>	3,90 <i>b s</i>	
<b>11</b>	6,25 <i>d</i> (9,5)	7,81 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,23 « <i>d</i> » (2,5)		0,71 <i>s</i>	5,06 <i>b s</i> BH 6,5	2,05 <i>s</i> bzw. 2,07
<b>12</b>	6,91 <i>d</i> (9,5)	7,95 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,46 « <i>d</i> » (2,5)		0,64 <i>s</i>	4,05 <i>b s</i> BH 8	
<b>14</b>	6,20 <i>b d</i> ( $\approx$ 9,5)	7,85 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,14 <i>b</i> « <i>d</i> » (2,5)		0,82 <i>s</i>	$\approx$ 5,25 <i>b s</i>	2,09 <i>s</i>
<b>15</b>	6,22 <i>d</i> (9,5)	7,86 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,17 <i>b s</i>		0,79 <i>s</i>	$\approx$ 4,24 <i>b s</i>	
<b>16</b>	6,22 <i>d</i> ( $\approx$ 10)	7,89 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (10 + 2,5)	7,17 <i>b d</i> (2,5)		0,82 <i>s</i>	5,24 <i>b s</i>	2,05 <i>s</i> bzw. 2,08
<b>19</b>	6,23 <i>d</i> (9,5)	7,76 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	$\approx$ 7,23		0,79 <i>s</i>	5,24 <i>b s</i> BH 7	2,06 <i>s</i> bzw. 2,09
<b>20</b>	6,20 <i>d</i> (9,5)	7,86 « <i>d</i> » (9,5)	7,27	1,00 <i>s</i> [1,000] <sup>4)</sup>	0,76 <i>s</i> [0,765]	4,15 <i>b s</i> BH 7	
<b>21</b>	6,21 <i>d</i> ( $\approx$ 9,5)	7,79 « <i>d</i> » (9,5)	7,12 <i>b s</i> BH 5,5	1,00 <i>s</i> [1,003] <sup>4)</sup>	0,86 <i>s</i> [0,830]	5,09 <i>b s</i> BH 7	2,04 <i>s</i>
<b>22</b>	6,20 <i>d</i> (9,5)	7,99 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,47 <i>d</i> (2,5)		0,67 <i>s</i>	$\approx$ 3,9 <i>b s</i>	
<b>25</b>	6,20 <i>d</i> (9,5)	7,91 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,16 <i>d</i> (2,5)		0,85 <i>s</i>	4,12 <i>b s</i> BH 7,5	
<b>26</b>	6,21 <i>d</i> (9,5)	7,9 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> (9,5 + 2,5)	7,17 <i>d</i> (2,5)		0,85 <i>s</i>	5,06 <i>b s</i> BH 8	2,05 <i>s</i>

*d* = Dublett, *s* = Singulett, *t*  $\times$  *d* = Triplet von Dublett, *d*  $\times$  *d* = Dublett von Dublett, BH = Signalbreite bei halber Höhe in Hz, *b* = breit, Ac = Acetoxygruppe, () Ausfpaltungen in Hz, [] berechneter Wert für die C(18)- bzw. C(19)–3 H-Protonen nach [14] und [15].

*CDCl<sub>3</sub>; (10, 12, 22 in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO + D<sub>2</sub>O; 7 bei 100 MHz in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO + D<sub>2</sub>O<sup>3</sup>)). Werte in ppm ± 0,025 = 0 ppm)*

C(4)—H: 3,97 b s

BH 5

C(4)-H: 3,99  $d \times d$

(7,5 + 2,5)

C(15)- $\alpha$ H: 4,26 b s

C(15)— $\alpha$ H: 4.26 *d*

(5)

C(15)— $\alpha$ H: 5,14 *d*      C(15)— $\beta$ Ac: 2,09 *s*  
 (5)                                      bzw 2,05

C(1.5)- $\beta$ H: 4.59 d  $\times$  d

0(15)  $\mu$   
(9.5 + 2)

C(15)– $\beta$ H:  $\approx 5,1$       C(15)– $\alpha$ Ac: 2,06 s  
hzw. 211

C(16)- $\alpha$ H:

C(19)—2 H: A<sup>5</sup>) 4,31 C(19)—Ac: 2,05 s  
 $d(11)$  B<sup>5</sup>) 4,02  $d(11)$  bzw. 2,07

C(19)–1 H: 10,07 s C(16)– $\alpha$ H: 4,6  
 «b.d» ( $\approx$  9)

C(19)—AH: 9,99 s      C(16)— $\alpha$ H: 5,44      C(16)— $\beta$ Ac: 1,89 s      C(15)— $\alpha$ H: 3,65 b s  
 b.  $\delta_{\text{d}}$  ( $\approx$  9)      BH: 3

$$\text{C(16)-}\alpha\text{H: 5,44} \quad \text{C(16)-}\beta\text{Ac: 1,88 s} \quad \text{C(15)-}\alpha\text{H: 3,60 b s}$$

$$d \times d \ (0 + 1,5) \quad \text{BH 3}$$

C(19)—2H: 4,40 s C(19)—Ac: 2,05 s C(16)— $\alpha$ H: 5,46 b d C(16)— $\beta$ Ac: 1,88 s C(15)— $\alpha$ H: 3,65 b s BH: 3,08 s

$$\text{C(19)} - 2\text{H: } 4,40\text{ s} \quad \text{C(19)} - \text{Ac: } 2,06\text{ s} \quad \text{C(15)} - \alpha\text{H: } 3,25\text{ b s}$$

$$\text{C}(16)-\alpha\text{H: } 5,43 \text{ } d \quad \text{C}(16)-\beta\text{Ac: } 1,90 \text{ } s \quad \text{C}(15)-\alpha\text{H: } 3,64 \text{ } b \text{ } s \quad \text{C}(12)-\alpha\text{H: } \approx 3,4 \text{ } s$$

(9,5) BH 3  
 $\text{C}(16)-\alpha\text{H}$ : 5,47 *d*     $\text{C}(16)-\beta\text{Ac}$ : 1,89 *s*     $\text{C}(15)-\alpha\text{H}$ : 3,68 *b s*     $\text{C}(12)-\alpha\text{H}$ : 4,62     $\text{C}(12)-\beta\text{Ac}$ :

C(16)- $\alpha$ H: 4,65      C(15)- $\alpha$ H: 3,55 b s

$$C(16)-\alpha H: 5,44 \quad C(16)-\beta Ac: 1,89 \text{ s} \quad C(15)-\alpha H: 3,62 \text{ d}$$

$$d \times d \ (9,5+1,5) \quad (1,5) \\ C(16)-\alpha H: 5,45 \quad C(16)-\beta Ac: 1,88 \ s \quad C(15)-\alpha H: 3,62 \ d$$

3) D. H. Hause, D. G. Eakle, and R. G. Gandy, *J. E. H.*

<sup>3)</sup> Den Herren Dr. G. Englert und P. Casagrande (F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel) danken wir für die Aufnahme der 100 MHz-Spektren.

<sup>4)</sup> Berechneter Wert nach Tab. 4 von Tamm & Gsell [15].

5) AB-Spektrum, 4 Linien, berechneter Wert für  $H_A$  bzw.  $H_B$

Tabelle 2. *Schmelzpunkte, Molekular-Ionen<sup>6)</sup> und Summenformeln*

Substanzen		Smp.	$M^+ m/e$	Summenformel
<b>1</b>	$3\beta,4\beta,14$ -Trihydroxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= 4 $\beta$ -Hydroxybufalin)	152–156°	402	$C_{24}H_{34}O_5$
<b>2</b>	$3\beta$ -Acetoxy- $4\beta,14$ -dihydroxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	158–165°	444	$C_{26}H_{36}O_6$
<b>3</b>	$3\beta,4\beta$ -Diacetoxyl-14-hydroxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	86–91°	486	$C_{28}H_{38}O_7$
<b>4</b>	$3\beta,14,15\beta$ -Trihydroxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20-22-dienolid (= 15 $\beta$ -Hydroxybufalin)	266–269°	402	$C_{24}H_{34}O_5$
<b>5</b>	$3\beta$ -Acetoxy- $14,15\beta$ -dihydroxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	273–277°	444	$C_{26}H_{36}O_6$
<b>6</b>	$3\beta,15\beta$ -Diacetoxyl-14-hydroxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	amorph	486	$C_{28}H_{38}O_7$
<b>7</b>	$3\beta$ -Acetoxy- $14,15\alpha$ -dihydroxy- $5\beta,14\alpha$ -bufa-20,22-dienolid	170–240°	444	$C_{26}H_{36}O_6$
<b>8</b>	$3\beta,15\alpha$ -Diacetoxyl-14-hydroxy- $5\beta,14\alpha$ -bufa-20,22-dienolid	242–245°	486	$C_{28}H_{38}O_7$
<b>9</b>	$3$ -Oxo-14-hydroxy- $16\beta$ -acetoxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= Bufotalon)	275–278°	442	$C_{26}H_{34}O_6$
<b>10</b>	$3\beta,14,19$ -Trihydroxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= 19-Hydroxybufalin)	227–233°	402	$C_{24}H_{34}O_5$
<b>11</b>	$3\beta,19$ -Diacetoxyl-14-hydroxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	225–245°	486	$C_{28}H_{38}O_7$
<b>12</b>	$3\beta,5,16\beta$ -Trihydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $19$ -oxo- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= 19-Oxodesacetylcinobufotalin)	amorph	430	$C_{24}H_{30}O_7$
<b>14</b>	$3\beta,16\beta$ -Diacetoxyl-5-hydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $19$ -oxo- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	235–244°	514	$C_{28}H_{34}O_9$
<b>15</b>	$3\beta,5,19$ -Trihydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $16\beta$ -acetoxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= 19-Hydroxycinobufotalin)	248–253°	474	$C_{26}H_{34}O_8$
<b>16</b>	$3\beta,16\beta,19$ -Triacetoxyl-5-hydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	245–251°	558	$C_{30}H_{38}O_{10}$
<b>17</b>	$3\beta,5$ -Dihydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $19$ -oxo- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= Bufotalinin)	212–255°	414	$C_{24}H_{30}O_6$
<b>19</b>	$3\beta,19$ -Diacetoxyl-5-hydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= Diacetyl-19-hydroxy-marinobufagin)	148–150°	500	$C_{28}H_{36}O_8$
<b>20</b>	$3\beta,12\beta$ -Dihydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $16\beta$ -acetoxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= 12 $\beta$ -Hydroxycinobufagin)	256–266°	398 ( $M^+ - 60$ )	$C_{26}H_{34}O_7$
<b>21</b>	$3\beta,12\beta,16\beta$ -Triacetoxyl- $14,15\beta$ -epoxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	157–163°	542	$C_{30}H_{38}O_9$
<b>22</b>	$3\beta,16\beta,19$ -Trihydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= 19-Hydroxydesacetylcinobufagin = Desacetylcinobufaginol)	amorph	416	$C_{24}H_{32}O_6$
<b>24</b>	$3\beta,16\beta,19$ -Triacetoxyl- $14,15\beta$ -epoxy- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	186–205°	542	$C_{30}H_{38}O_9$
<b>25</b>	$3\beta,10\beta$ -Dihydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $16\beta$ -acetoxy- $19$ -nor- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid (= 10 $\beta$ -Hydroxy-19-nor-cinobufagin)	150–154°	444	$C_{25}H_{32}O_7$
<b>26</b>	$3\beta,16\beta$ -Diacetoxyl- $10\beta$ -hydroxy- $14,15\beta$ -epoxy- $19$ -nor- $5\beta,14\beta$ -bufa-20,22-dienolid	270–279°	486	$C_{27}H_{34}O_8$

<sup>6)</sup> Den Herren Dr. W. Vetter, B. Meier und W. Meister (F. Hoffmann-La Roche & Co AG, Basel) danken wir für die Aufnahme und Hilfe bei der Interpretation der Massenspektren.

Strukturbeweis wurde **7** zum bekannten  $3\beta$ -Acetoxy-14-hydroxy-15-oxo- $5\beta$ , $14\alpha$ -ätiensäure-methylester [4] abgebaut. *Per exclusionem* ergibt sich dann die Struktur der Verbindung **4** und ihrer Derivate. – **9** konnte durch direkten Vergleich als Bufotalon [6] identifiziert werden. – Die Struktur der Alkohole **10**, **15** und **18** (letzterer wurde als solcher nicht isoliert) bzw. die ihrer Acetylverbindungen **11**, **16** und **19** ergeben sich aus den spektroskopischen Daten (siehe Tab. 1 und 2). Die Struktur von **15** wurde zusätzlich durch Reduktion des bekannten **14** [2], die von **19** durch Reduktion und Acetylierung von vorher aus der Droge isoliertem Bufotalinin **17**, gesichert. – Für die Substanz **20** sowie ihre Acetylverbindung **21**, welche im NMR. eine ähnliche Aufspaltung zeigt, wie sie bei der Substanz **3** für das C(4)- $\alpha$ -H beobachtet wird, konnte eine C(1)-OH-Gruppe durch die Berechnung der Methylgruppenverschiebung ausgeschlossen, eine C(12)- $\beta$ -Sauerstofffunktion dagegen sehr wahrscheinlich gemacht werden (siehe Tab. 1). Die der Substanz **25** zugeschriebene Struktur basiert auf den von *v. Wartburg et al.* [19] am Beispiel des Strophanthidins gemachten Befunden. Danach wäre **25** durch Autoxydation von **27** entstanden. Das konnte experimentell verifiziert werden. Wie im exp. Teil beschrieben, geht auch **28** durch Autoxydation in **26** über. – Darüber hinaus blieb die 3-Keto-Verbindung von **25** unter den üblichen Bedingungen [20]<sup>7</sup>), die bei 3-Keto-5-hydroxy-Verbindungen eine Anhydrisierung bewirken, unverändert, womit für **25** eine C(5)-OH-Gruppe ausgeschlossen werden kann. Ein chemischer Beweis für die  $\beta$ -Orientierung der C(10)-OH-Gruppe liess sich in den vorliegenden Fällen nicht durchführen, doch kann eine  $\alpha$ -Ständigkeit der C(10)-OH-Gruppe mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da dann Ring B von **25** bzw. **26** in der energetisch ungünstigen Wannenform vorliegen müsste.

Dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. – Frl. *U. Boffo* und Herrn *E. Hauser* danken wir für ihre Mitarbeit bei der Auftrennung von Substanzgemischen.

### Experimenteller Teil

*Allgemeine Angaben.* Alle Smp. wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehler bis  $200^\circ$  etwa  $\pm 2^\circ$ , darüber etwa  $\pm 3^\circ$ .

*Abkürzungen:* DC. = Dünnschicht, Dünnschichtchromatographie bzw. dünnschichtchromatographisch, PDC. = präparative Dünnschichtchromatographie(n), Pl. = präparative Dünnschichtplatten ( $20 \times 20$  cm), C., SC. und SC\*. = Säulenchromatographie (siehe exp. Teil von [21] [22], Z. = Zone(n), Fr. = Fraktion(en),  $\text{SiO}_2$  = Kieselgel (zur Säulenchromatographie «Merck» 0,05–0,2 mm; DC. und PDC. «Camag» DF-5), ML. = Mutterlauge(n)rückstände, LMG. = Lösungsmittelgemisch, Lösungsmittel: Ae = Äther, An = Aceton, Chlf = Chloroform, Cy = Cyclohexan, E = Essigsäure, Ipä = Isopropyläther, Ipalk = Isopropylalkohol, Me = Methanol, Py = Pyridin.

DC.: Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurde nach Besprühen mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /Äthanol 1:1 auf etwa  $130$ – $150^\circ$  erhitzt. Die gebildeten Flecke wurden bei Tageslicht und im UV.-Licht (Universal-UV.-Lampe «Camag», Typ TL 900 bei Schaltung 254 nm und 350 nm) ausgewertet. – PDC.: Die Platten hatten eine Schichtdicke von 0,5 mm. Die Markierung der gewanderten Substanzen erfolgte im UV.-Licht (bei Schaltung 254 nm) oder nach Besprühen mit  $\text{H}_2\text{O}$ , die Extraktion der herausgeschabten  $\text{SiO}_2$ -Schichten mit Chloroform/Äthanol 1:1. In den PDC. sind die extrahierten Z. nach abnehmendem Rf-Wert numeriert.

*Analytisches:* Die Molekulargewichte wurden massenspektroskopisch mit einem MS-9-Massenpektrometer der Firma *AEI* bei etwa 70 eV und mit Direkteinlass bestimmt<sup>8</sup>). Als Lösungsmittel für die Aufnahme der UV.-Spektren diente 96proz. Äthanol, für diejenige der IR.-Spektren Chloroform.

<sup>7</sup>) Siehe dazu auch [2] und [22].

Isolierung von **1** und **4**: SC. 14 und PDC. 55-56SC. 14: Fr. 50-59 (1,18 g) von total 1,325 g aus SC.\* 5 [22] an 150 g SiO<sub>2</sub> (Säule Ø 2,6 cm)

Fr.	LMG.	Eindampfrückstand	
	40 ml/Fr.	Menge (mg)	DC. Chlf/Me 99:1, 9:1
1- 20	Chlf	-	
21- 26	Chlf/Me 99:1	-	
27- 42	Chlf/Mc 99:1	41	Cinobufagin
43- 50	Chlf/Me 99:1	92	Substanzen mit Rf < Cinobufagin, > Cinobufotalin
51-136	Chlf/Me 99:1	290	Cinobufotalin, Bufotalin, Substanzen mit Rf < Cinobufotalin
137-155	Chlf/Me 49:1	62	Cinobufotalin (wenig), Substanzen mit Rf < Cinobufotalin
156-200	Chlf/Me 49:1	165	Substanzen Rf < Cinobufotalin
201-240	Chlf/Me 49:1	95	Desacetylbufotalin [8], Substanzen von Rf ≈ Desacetylbufotalin
241-250	Chlf/Me 24:1	58	Desacetylbufotalin [8], Substanzen von Rf ≈ Desacetylbufotalin
251-263	Chlf/Me 24:1	107	Desacetylcinobufagin [8], Substanzen mit Rf < Desacetyl-cinobufagin
264-310	Chlf/Me 24:1	131	Desacetylcinobufagin, <b>1</b> und <b>4</b>
311-350	Chlf/Me 1:1	36	Substanzen mit Rf < <b>1</b> + 1% CH <sub>3</sub> COOH

PDC. 55: 131 mg aus Fr. 264-310 von SC. 14, 6 Pl., System: Chloroform/Methanol 9:1.

1. Z.: a) mittlerer Zonenteil, 39 mg **1+4**;b) äusserer Zonenteil, 19 mg **1+4**, Substanz mit Rf > **4**.

PDC. 56: 58 mg 1. Z. a)+b) von PDC. 55, 3 Pl., System: Äther/Methanol 19:1.

1. Z.: a) mittlerer Zonenteil, 15 mg **1**, aus Methanol-Äther (-70°) 5 mg Prismen vom Smp. 152-156°;b) äusserer Zonenteil, 14 mg u.a. **1**.2. Z.: 13 mg **4**, aus Aceton/Äther 10 mg Nadeln vom Smp. 266-269.Acetylverbindung **3**: Die 14 mg aus der 1. Z. b) von PDC. 56 wurden in Pyridin/Essigsäureanhydrid 12 Std. bei 37° acetyliert und in PDC. 57 gereinigt.PDC. 57: 16 mg u. a. **3**, 1 Pl., System: Methylenchlorid/Äthanol 19:1.1. Z.: 7 mg **3** (roh).

PDC. 58: 7 mg 1. Z. von PDC. 57, 1/2 Pl., System: Äther/Petroläther 9:1, 2× entwickelt.

1. Z.: 5 mg **3** aus Äther 3 mg Prismen vom Smp. 86-91°.Acetylverbindungen **5** und **6**: 7 mg kristallines **4** wurden in Pyridin/Acetanhydrid 12 Std. bei 37° acetyliert und in PDC. 59 gereinigt.PDC. 59: 7,5 mg **5+6** (roh, 1/2 Pl., System: Methylenchlorid/Äthanol 19:1.1. Z.: 3 mg **6** amorph, nach DC. Methylenchlorid/Äthanol 19:1 einheitlich.2. Z.: 1 mg **5**.Acetylverbindungen **2** und **5**: Die ML. (3 mg) aus der 2. Z. von PDC. 56 wurde in Pyridin/Acetanhydrid 12 Std. bei 37° acetyliert und in PDC. 60 getrennt.PDC. 60: 3,5 mg **2+5** (roh, 1/2 Pl., System: Methylenchlorid/Äthanol 19:1.1. Z.: 2,6 mg **5+2**.

PDC. 61: 2,6 mg 1. Z. aus PDC. 60, 1/3 Pl., System: Äther/Petroläther 9:1, 2× entwickelt.

1. Z.: 0,7 mg **5**, vereinigt mit der 2. Z. von PDC. 59, (1 mg) = 1,7 mg, aus Aceton/Äther 0,5 mg Prismen vom Smp. 255-263°. Vergleich mit partialsynthetischem **5** vom Smp. 273-277°: Misch-DC. (System: Chloroform/Methanol 97:3, nur ein Fleck; Misch-Smp. 260-278°).2. Z.: 1,3 mg **2** aus Äther/Petroläther 0,5 mg Prismen vom Smp. 158-165°.

## Isolierung von Bufotalon 9: SC. 15 und PDC. 62 und 63

SC. 15: Fr. 261–300 (770 mg) von SC.\* 11 [23] an 80 g SiO<sub>2</sub> (Säule Ø 2,1 cm)

Fr.	LMG.	Eindampfrückstand	
	40 ml/Fr.	Menge (mg)	DC. Chlf/Me 19:1
1– 25	Chlf	–	
26– 50	Chlf/Me 99:1	–	
51– 65	Chlf/Me 99:1	240	Bufalin, 19-Oxocinobufagin, 9, Cinobufotalin
66– 98	Chlf/Me 99:1	200	Cinobufotalin, Bufotalin
99–175	Chlf/Me 99:1	75	Substanzen mit Rf < Bufotalin
176–215	Chlf/Me 7:3	255	unbekannte Substanz aus Chloroform/Methanol, Prismen vom Smp. 232–233°, Substanzen mit Rf < Bufotalin

PDC. 62: 240 mg aus Fr. 51–65 von SC. 15, 10 Pl., System: Chloroform/Methanol 19:1.

1. Z.: 73 mg 9 (roh).

2. Z.: 28 mg 19-Oxocinobufagin, Substanzen mit Rf ≈ 19-Oxocinobufagin.

PDC. 63: 73 mg 1. Z. aus PDC. 62, 4 Pl., System: Äther/Essigester/Petroläther 3:1:1, 2× entwickelt.

1. Z.: 48 mg 9, aus Aceton 33 mg Blättchen vom Smp. 273–276°. Vergleich mit Bufotalon vom Smp. 275–278°: IR-, NMR.-Spektren identisch, Misch-DC. (Benzol/Aceton/Cyclohexan 1:1:1) nur ein Fleck, Misch-Smp. 273–277°.

**Bufotalon (9) aus Bufotalin.** Eine Lösung von 50 mg Bufotalin in 0,5 ml Aceton wurde bei 0° mit 2 Tropfen Kiliani-Lösung [24] versetzt. Nach 10 Min. wurden 0,5 ml Methanol und 0,5 ml Wasser zugefügt, hierauf im Vakuum konzentriert, 3mal mit Chloroform ausgeschüttelt, dieses mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft. Der durch PDC. (Benzol/Aceton/Cyclohexan 1:1:1) gereinigte Eindampfrückstand (33 mg) gab aus Aceton 25 mg Blättchen vom Smp. 275–278°.

**Isolierung von 10, 12 und 22.** – Die 0,41 g aus den Fr. 248–261 von C. 1 wurden mit dem Neutralteil (0,87 g), gewonnen aus den Fr. 262–272 von C. 1 und den Fr. 224–230 von C. 2 (siehe exp. Teil von [21]) mit 350 mg der Fr. 705–783 aus SC.\* 13 (siehe exp. Teil Tab. 5 von [23]) vereinigt (total 1,63 g) und in SC.\* 16 chromatographiert.

SC.\* 16: 1,63 g Eindampfrückstände (u.a. Desacetylcinobufotalin, 10, 12 und 22) an 250 g SiO<sub>2</sub> (Säule Ø 3,2 cm)

Fr.	LMG.	Eindampfrückstand	
	40 ml/Fr.	Menge (mg)	DC. Chlf/An 7:3, Cy/Ipalk 3:2+1% Eisessig Cy/An 1:1, Ipä/Me 17:3
1– 78	Chlf/An 7:3	460	Substanzen Rf. > Desacetylcinobufotalin
79– 97	Chlf/An 7:3	107	Desacetylcinobufotalin
98–158	Chlf/An 7:3	181	Desacetylcinobufotalin, 12, Substanzen Rf < 12 > 10
159–176	Chlf/An 7:3	59	Substanzen Rf < 12 > 10
177–212	Chlf/An 7:3	195	10, 22, Substanzen mit Rf > 10
213–259	Chlf/An 7:3	140	10, 22, Substanzen mit Rf > 10
260–318	Chlf/An 7:3	122	10 (wenig), Substanzen Rf ≈ 10 und 22
319–336	Chlf/An 7:3	67	Substanzen mit Rf < 22
337–370	Chlf/Me 1:1 + 1% Eisessig	236	Substanzen mit Rf < 22

PDC. 64: 181 mg aus Fr. 98–158 von SC.\* 16, 8 Pl., System: Cyclohexan/Isopropylalkohol 3:2 + 1% Eisessig.

1. Z.: 14 mg Desacetylcinobufotalin.

2. Z.: 21 mg 12, amorph nach DC. (Cyclohexan/Isopropylalkohol 3:2 + 1% Eisessig) einheitlich.

3. Z.: 48 mg Substanz Rf &lt; 12 &gt; 10, 10 (wenig).

*Acetylverbindung 14*: 4 mg **12** wurden bei 80° in Pyridin/Acetanhydrid 2 Std. acetyliert und in *PDC. 65* gereinigt.

*PDC. 65*: 4,5 mg **14** (roh),  $\frac{1}{2}$  Pl., System: Isopropyläther/Methanol 17:3.

1. Z.: 3 mg **14**, aus Methanol/Äther/Petroläther 0,8 mg Nadeln vom Smp. 235–244°. Vergleich mit 3-O-Acetyl-19-oxocinobufotalin (**14**) [2] vom Smp. 225–238°: IR- und NMR-Spektren identisch, Misch-DC. (Cyclohexan/Aceton 1:1) nur ein Fleck, Misch-Smp. 229–244°.

*PDC. 66*: 335 mg aus Fr. 177–259 von *SC.\* 16*, 16 Pl., System: Chloroform/Methyläthylketon/Methanol/Eisessig 75:20:5:2. 1. Entwicklung; nach Abblasen in der Wärme, 2. Entwicklung mit Chloroform/Methanol 19:1.

1. Z.: 106 mg **10** (roh).

2. Z.: 46 mg u.a. **22**.

*PDC. 67*: 106 mg 1. Z. von *PDC. 66*, 6 Pl., System: Cyclohexan/Isopropylalkohol 3:2.

1. Z.: 76 mg **10**, aus Essigester/Aceton/Äther 26 mg Prismen vom Smp. 227–233°.

*Acetylverbindung 11*: Die ML. (50 mg) aus der 1. Z. von *PDC. 67* wurde in Pyridin/Acetanhydrid 2 Std. bei 80° acetyliert und in *PDC. 68* gereinigt.

*PDC. 68*: 55 mg u.a. **11**, 2 Pl., System: Isopropyläther/Methanol 19:1.

1. Z.: 25 mg **11**, aus Chloroform/Äther 11 mg Prismen vom Smp. 225–245°.

*PDC. 69*: 46 mg 2. Z. von *PDC. 66*, 2 Pl., System: Äther/Methanol 93:7, 3 x entwickelt.

1. Z.: 7 mg **22** amorph, nach DC. (Aceton/Cyclohexan 1:1), 1 polare, schwache Verunreinigung.

*Acetylverbindung 24*: 6 mg der 1. Z. aus *PDC. 69* wurden in Pyridin/Acetanhydrid 2 Std. bei 80° acetyliert und in *PDC. 70* gereinigt.

*PDC. 70*: 6,8 mg **24** (roh),  $\frac{1}{2}$  Pl., System: Aceton/Cyclohexan 3:7.

1. Z.: 3 mg **24** aus Äther/Aceton 1 mg Prismen vom Smp. 186–199°. Vergleich mit 3,19-Di-acetyl-cinobufaginol (**24**) [10] vom Smp. 202–206°: IR-Spektren identisch, Misch-DC. (Aceton/Cyclohexan 3:7) nur ein Fleck, Misch-Smp. 186–205°.

#### *Isolierung von 15 SC.\* 17 und PDC. 71–73*

*SC.\* 17*: 3,74 g Eindampfrückstände (2,93 g Arenobufagin enthaltende Fr. aus dem Neutralteil von C. 1 Fr. 197–208 [21] und 0,81 g Arenobufagin-ML. aus C. 2 Fr. 205–211 [21]) an 200 g SiO<sub>2</sub> (Säule  $\varnothing$  2,6 cm)

Fr.	LMG.	Eindampfrückstand		
		500 ml/Fr.	Menge (mg)	DC. E/Cy 17:3
1–6	E/Cy 3:2	–		
7–11	E/Cy 3:2	1509		Arenobufagin, aus Aceton 1,08 g Kristalle vom Smp. 219–232°
12–18	E/Cy 3:2	160		Arenobufagin, Desacetylbufotalin
19–25	E/Cy 3:2	155		Arenobufagin (wenig), Substanz mit Rf < Arenobufagin, > Desacetylbufagin, Desacetylbufagin, Telocinobufagin
26–27	E/Cy 3:2	157		Desacetylbufagin, Telocinobufagin
28–31	E/Cy 3:2	318		Desacetylbufagin, Telocinobufagin, Substanz mit Rf < Telocinobufagin
32–37	E/Cy 3:1	397		Desacetylbufagin, Substanz mit Rf $\approx$ Desacetylbufagin
38–41	E/Cy 3:1	147		Desacetylbufagin, Substanz mit Rf $\approx$ Desacetylbufagin, Cinobufaginol ( <b>23</b> )
42–55	E/Cy 3:1	224		Desacetylbufagin (wenig), Cinobufaginol ( <b>23</b> ), Cinobufotalinol ( <b>15</b> ), Substanzen Rf < Cinobufaginol ( <b>23</b> )
56–70	Chlf/Me 13:7 + 1% Eisessig	140		Substanzen Rf < Cinobufaginol ( <b>23</b> )

- PDC. 71: 224 mg aus Fr. 42–55 von SC.\* 17, 10 Pl., System: Chloroform/Aceton 1:1.  
 1. Z.: 63 mg Cinobufaginol (23), nach PDC.-Reinigung im System Benzol/Methanol 9:1, aus Aceton/Äther Kristalle vom Smp. 235–241°.  
 2. Z.: 125 mg Cinobufotalinol (15), Substanzen mit Rf < Cinobufotalinol.
- PDC. 72: 125 mg 2. Zone von PDC. 71, 5 Pl., System: Chloroform/Methanol 24:1, 2× entwickelt.  
 1. Z.: 6,5 mg Cinobufotalinol (15), nach DC. im gleichen System nicht einheitlich.
- PDC. 73: 6,5 mg 1. Z. von PDC. 72, 1/2 Pl., System: Cyclohexan/Aceton 1:1.  
 1. Z.: 2 mg Cinobufotalinol (15), aus Methanol/Äther 0,5 mg Nadeln vom Smp. 240–252°. Vergleich mit dem partialsynthetischen Produkt (siehe unten): IR.-Spektrum identisch, Misch-DC. im System Cyclohexan/Aceton 1:1 nur ein Fleck, Misch-Smp. 240–253°.
- Isolierung von Bufotalinin (17).* 30 mg aus den Fr. 26–30 von C.\* 13 (siehe exp. Teil von [21]), welche nach DC. neben 13 17 enthielten, wurden in PDC. 74 getrennt.
- PDC. 74: 30 mg 13 und 17, 1 Pl., System: Essigester/Petroläther 9:1.  
 1. Z.: 15 mg 13, amorph.  
 2. Z.: 5,5 mg 17 aus Methanol/Äther 2,5 mg zu Drusen vereinigte Prismen vom Smp. 212–225°. Vergleich mit Bufotalinin (17): Misch-DC. (Essigester/Petroläther 9:1) nur ein Fleck.

*Isolierung von 20 und Bereitung von 21.* Die unter 6 erwähnten Rest-Fr. im exp. Teil von [2] wurden wieder vereinigt. Sie enthielten nach DC. die Korksäurehalbester von Cinobufagin und Resibufogenin [25] sowie die Bufogenine Arenobufagin 20, Desacetylcinobufagin und Substanzen von kleinerem Rf als letzteres. Auf trennung siehe SC. 18.

SC. 18: Auf trennung von Arenobufagin-ML. (etwa 3 g) an 350 g SiO <sub>2</sub> (Säule Ø 3,8 cm)			
Fr.	LMG.	Eindampfrückstand	
	350 ml/Fr.	Menge (mg)	DC. Chlf/Me 93:7
1–10	Chlf	–	
11–20	Chlf/Me 199:1	–	
21–28	Chlf/Me 99:1	30	Substanzen mit Rf > Cinobufotalin
29–34	Chlf/Me 49:1	15	Cinobufotalin
35–42	Chlf/Me 49:1	280	Cinobufaginkorksäurehalbester (Isolierung siehe exp. Teil von [2]), Spur Cinobufotalin
43–55	Chlf/Me 49:1	1070	3-Cinobufagyl-, 3-Resibufogenyl-korksäurehalbester, Arenobufagin
56–61	Chlf/Me 24:1	360	3-Cinobufagyl-, 3-Resibufogenyl-korksäurehalbester, Arenobufagin, 20
62–72	Chlf/Me 24:1	589	3-Cinobufagyl- (wenig), 3-Resibufogenyl-korksäurehalbester, Arenobufagin
73–85	Chlf/Me 4:1	610	Desacetylcinobufagin, Substanzen von Rf < Desacetyl-cinobufagin, 20

*Abtrennung der Korksäurehalbester.* – Die Eindampfrückstände der Fr. 56–61 (360 mg) von SC. 18 wurden in Chloroform gelöst und im Scheidetrichter mit verdünnter Sodalösung ausgezogen. Die mit Chloroform gewaschenen Soda auszüge wurden mit HCl eben kongosauer gemacht, mit Chloroform extrahiert, dieses nach Waschen mit Wasser über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft (= 140 mg). Die mit Sodalösung extrahierte organische Phase wurde nach Waschen mit Wasser über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert, eingedampft (= 220 mg) und in PDC. 75 weiter aufgetrennt. Analog wie oben beschrieben, wurden 489 mg der Fr. 62–72 aus SC. 18 ausgeschüttelt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergab 311 mg. 121 mg davon wurden in PDC. 77 aufgetrennt. Die verbleibenden 190 mg wurden in Pyridin/Acetanhydrid 12 Std. bei 37° acetyliert und in PDC. 79 chromatographiert.

- PDC. 75: 220 mg (Neutralteil) aus Fr. 56-61 von SC. 18, 8 Pl., System: Petroläther/Benzol/Aceton 10:10:13.  
 1. Z.: 49 mg **20**, Substanzen mit Rf > **20**.
- PDC. 76: 49 mg 1. Z. von PDC. 75, 2 Pl., System: Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:9:1.  
 1. Z.: 20 mg **20** (roh).  
 2. Z.: 11 mg Substanz Rf > **20**.
- PDC. 77: 121 mg (Neutralteil) aus Fr. 62-72 von SC. 18, 6 Pl., System: Essigester/Cyclohexan 9:1.  
 1. Z.: 20 mg **20** (roh).  
 2. Z.: 11 mg Substanz mit Rf > **20**.
- PDC. 78: 20 mg 1. Z. von PDC. 76 und 20 mg 1. Z. von PDC. 77, 2 Pl., System: Petroläther/Aceton 7:3.  
 1. Z.: 24 mg **20**, aus Essigester/Äther 11 mg Prismen vom Smp. 256-266°.
- PDC. 79: 210 mg (siehe oben unter «Abtrennung der Korksäurehalbester») u.a. **21**, 8 Pl., System: Chloroform/Methanol 197:3.  
 1. Z.: 65 mg **21**, Substanz Rf > **21**.
- PDC. 80: 65 mg 1. Z. von PDC. 79, 4 Pl., System: Petroläther/Aceton 17:3, 4 x entwickelt.  
 1. Z.: 32 mg **21**, aus Äther/Petroläther 23 mg Prismen vom Smp. 157-163°.

*Isolierung von 25.* - Von den Eindampfrückständen (847 mg) der Fr. 52-70 von C. 4 (Chromatographie von Bufalin-ML. siehe exp. Teil von [20]) wurden 350 mg in PDC. 81 aufgetrennt. Die verbleibenden 497 mg wurden wie oben beschrieben mit verdünnter Sodalösung ausgeschüttelt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase (410 mg) wurde in SC. 19 aufgetrennt. (Eindampfrückstand der zurückgeschüttelten Soda-Auszüge: 87 mg).

SC. 19: Fr. 52-70 (Neutralteil 410 mg) aus C. 4 [21] und Fr. 244-310 (805 mg) aus SC\* 12 [23] an 300 g SiO<sub>2</sub> (Säule Ø 4,0 cm)

Fr.	LMG.	Eindampfrückstand	
		40 ml/Fr.	Menge (mg)
1- 30	Chlf/Mc 49:1	—	
31- 44	Chlf/Mc 49:1	134	Cinobufagin, Resibufogenin
45- 79	Chlf/Mc 49:1	155	Resibufogenin, Bufalin, Cinobufotalin, Bufotalin
80-120	Chlf/Mc 49:1	149	Bufotalin
121-131	Chlf/Mc 24:1	40	Substanzen mit Rf < Bufotalin, Desacetylcinobufagin
132-139	Chlf/Mc 24:1	66	Desacetylcinobufagin, <b>25</b>
140-145	Chlf/Mc 24:1	60	Desacetylcinobufagin, <b>25</b> , Substanz mit Rf < <b>25</b>
146-151	Chlf/Mc 24:1	35	Desacetylcinobufagin, Substanzen mit Rf < <b>25</b>
152-183	Chlf/Mc 24:1	91	Desacetylcinobufagin, Telocinobufagin, Gamabufotalin
184-200	Chlf/Mc 9:1	73	Telocinobufagin, Gamabufotalin, Hellebrigenin
201-216	Chlf/Mc 9:1	72	Desacetylcinobufotalin
217-250	Chlf/Mc 13:7 + 1% Eisessig	166	Substanzen mit Rf < Desacetylcinobufotalin

PDC. 81: 350 mg aus Fr. 52-70 von C. 4 [21], 10 Pl., System: Essigester/Petroläther 17:3.

1. Z.: 96 mg **25**, Desacetylcinobufagin, Substanz mit Rf ≈ **25**.

PDC. 82: 96 mg 1. Z. von PDC. 81, 4 Pl., System: Petroläther/Benzol/Aceton 1:1:1.

1. Z.: a) mittlerer Zonenteil, 15 mg **25**, Spur Desacetylcinobufagin;

b) äusserer Zonenteil, 13 mg **25**, Desacetylcinobufagin.

2. Z.: 19 mg Desacetylcinobufagin.

PDC. 83: 66 mg aus Fr. 132-139 von SC. 19 und 15 mg 1. Z. a) von PDC. 82, 4 Pl., System: Petroläther/Aceton 16:9.

1. Z.: 18 mg **25**, 8 mg gaben aus Methanol/Äther 1,5 mg Prismen vom Smp. 150-154°.

*Acetylverbindung 26*: Die 60 mg aus den Fr. 140–145 von *SC. 19* wurden in Pyridin/Acetanhydrid 2 Std. bei 80° acetyliert und in *PDC. 84* gereinigt. Analog wurden 10 mg der 1. Z. von *PDC. 83* acetyliert und in *PDC. 85* gereinigt.

*PDC. 84*: 68 mg u.a. **26**, 3 Pl., System: Aceton/Cyclohexan 1:4, 5× entwickelt.

1. Z.: 7 mg **26** (roh).

*PDC. 85*: 11 mg **26** (roh) und 7 mg 1. Z. von *PDC. 84*, 1 Pl., System: Chloroform/Methanol 99:1, 2× entwickelt.

1. Z.: 10 mg **26**, aus Aceton/Petroläther 6 mg Kristalle (Plättchen) vom Smp. 270–279°.

*3,4-Diketon aus 1*. – Eine Lösung von 0,5 mg **1** in 3 Tropfen Aceton wurde bei 0° mit 1 Tropfen *Kiliani*-Lösung [24] versetzt, nach 10 Min. 3 Tropfen Methanol und 0,5 ml H<sub>2</sub>O zugefügt, hierauf im Vakuum konzentriert, mit Chloroform 3mal ausgeschüttelt, mit H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft. Der Eindampfrückstand zeigte im DC. (Chloroform/Methanol 19:1) neben dem Fleck, der dem 3,4-Diketon entsprach, eine geringe unpolare Verunreinigung. UV.-Spektrum siehe theoret. Teil.

Darstellung von **5**, **6**, **7** und **8**. – 1,2 g 3-O-Acetyl-14,15-anhydrobufalin, gelöst in 10 ml Aceton und 2,5 ml Äther wurden mit 1,25 ml OsO<sub>4</sub>-Lösung (0,1 g OsO<sub>4</sub> in 20 ml *t*-Butanol und 3 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) [15]) versetzt. Nach 1/2, 2 und 3 Tagen wurden jeweils 1 ml OsO<sub>4</sub>-Lösung erneut zugefügt. Nach 6 Tagen wurden zur Reaktionslösung 30 ml einer Mischung von Chloroform/Äther 1:3 zugefügt, 4mal mit verd. Sodalösung, 2mal mit verd. Salzsäure, 1mal mit H<sub>2</sub>O ausgeschüttelt und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft = 1,2 g öliger brauner Rückstand. Letzterer wurde an 150 g SiO<sub>2</sub> mit Methyläthylketon/*n*-Heptan 1:2 chromatographiert. Dabei wurden 110 mg eines Gemisches von **5** und **7** erhalten, welches in *PDC. 86* aufgetrennt wurde.

*PDC. 86*: 110 mg u.a. **5** und **7**, 5 Pl., System: Chloroform/Methanol 97:3.

1. Z.: 11 mg unpolare Anteile.

2. Z.: 14 mg **7**, aus Chloroform/Äther 4 mg Prismen vom Smp. 170–240°.

3. Z.: 30 mg **5**, aus Chloroform 22 mg feine Prismen vom Smp. 273–277°.

*Acetylverbindung 6*: 15 mg (8 mg ML. + 7 mg Kristalle aus der 3. Z. von *PDC. 86* wurden in Pyridin/Acetanhydrid 3 Std. bei 80° acetyliert und in *PDC. 87* gereinigt.

*PDC. 87*: 16 mg **6** roh, 1 Pl., System: Chloroform/Methanol 97:3, 2mal entwickelt.

1. Z.: 8 mg **6**, amorph nach DC. im gleichen System einheitlich.

*Acetylverbindung 8*: Die ML. (10 mg) aus der 2. Z. von *PDC. 86* wurde in Pyridin/Acetanhydrid 3 Std. bei 80° acetyliert und in *PDC. 88* gereinigt.

*PDC. 88*: 11 mg u.a. **8**, 1/2 Pl., System: Chloroform/Methanol 99:1, 3mal entwickelt.

1. Z.: 3 mg **8**, aus Aceton 0,7 mg Prismen vom Smp. 242–245°.

*Reduktion eines Gemisches von 13 und 17 zu 15 und 18 (letzteres nicht isoliert)*. Zu 154 mg Gemisch (aus Fr. 26–30 von *SC. \* 13* [21]) in 7,5 ml Methanol gelöst wurde bei –20° eine Lösung von 52 mg NaBH<sub>4</sub> in 4,5 ml Methanol zugefügt. Nach 30 Min. wurde mit verd. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert, Chloroform zugefügt, mit verd. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, verd. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O ausgeschüttelt, die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert, eingedampft (144 mg) und in *PDC. 89* aufgetrennt.

*PDC. 89*: 144 mg **15** und **18**, 6 Pl., System: Petroläther/Benzol/Aceton 1:1:1.

1. Z.: 94 mg **15** mit wenig **18**, aus Methanol/Äther 32 mg Prismen von **15** vom Smp. 248–253°.

*Acetylverbindungen 16 und 19*: Die ML. (62 mg) der 1. Z. von *PDC. 89* wurden in Pyridin/Acetanhydrid 12 Std. bei 37° acetyliert und in *PDC. 90* getrennt.

*PDC. 90*: 70 mg **16** und **19**, 3 Pl., System: Essigester/Petroläther 17:3.

1. Z.: 26 mg **16**, aus Methanol/Äther 19 mg zu Drusen vereinigte Nadeln vom Smp. 245–251°.

2. Z.: 16 mg **16** (wenig), **19**.

*PDC. 91*: 16 mg 2. Z. von *PDC. 90*, 1 Pl., System: Essigester/Petroläther 17:3.

1. Z.: 10 mg **19**, aus Aceton/Äther/Petroläther 7 mg Nadelchen vom Smp. 148–150°.

*3-Ketoverbindung von 25 und Versuch zur Wasserabspaltung*. Eine Lösung von 3 mg ML. der 1. Z. von *PDC. 83* in 0,5 ml Aceton wurde bei 0° mit einem Tropfen *Kiliani*-Lösung [24] versetzt. Nach 10 Min. wurden 0,5 ml Methanol und 0,5 ml H<sub>2</sub>O zugefügt, im Vakuum eingeengt, 3mal mit Chloroform ausgeschüttelt, mit H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft.

dampft. Der Eindampfrückstand wurde in 1 ml Eisessig gelöst und 2 Std. auf 95° erwärmt. Nach Entfernung des Eisessigs im Vakuum wurde der Rückstand in Benzol aufgenommen und erneut eingedampft (3mal wiederholt). Der Rückstand unterschied sich im DC. (Chloroform/Methanol 19:1) in Bezug auf Rf und Farbe nicht von dem der 3-Ketoverbindung. Das UV.-Spektrum zeigte keine Absorption im Bereich von 240 nm.

**26** durch *Autoxydation* von 3-O-Acetyl-19-oxo-cinobufagin (**28**). 2,5 mg MI. von **28** (enthält nach DC. bereits eine Spur **26**) wurde in 0,025 ml Aceton gelöst (Röhrchen ø 1,5 mm) und unverschlossen geschüttelt. Das verdunstete Aceton wurde jeweils ersetzt und nach 90 Std. das Autoxydationsprodukt im DC. Äther/Essigester/Petroläther 3:1:1, Essigester/Cyclohexan 3:7, Aceton/Petroläther 3:2, Chloroform/Methanol 49:1 untersucht: der Fleck, der dem oben isolierten **26** entsprach, war deutlich grösser als derjenige im Ausgangsmaterial.

*3β-Acetoxy-14-hydroxy-15-oxo-5β,14α-dtiensäure-methylester aus **7**.* 350 mg **7** gaben, wie oben bei der Bereitung der 3-Ketoverbindung von **25** beschrieben, 380 mg rohes Dehydrierungsprodukt. Daraus liess sich durch säulenchromatographische Auf trennung (an  $\text{SiO}_2$ ) ein unpolares Substanzgemisch gewinnen, das durch weitere Aufteilung auf DC. (0,5 mm, System Petroläther/Benzol/Aceton 1:1:1) in verschiedene Zonen aufgetrennt werden konnte. Das aus der Zone mit dem grössten Rf-Wert eluierte Material gab nach erneuter DC. (0,5 mm, System Essigester/Cyclohexan 1:1) eine grosse Zone unpolaren Materials, das nach Extraktion 52 mg Substanz lieferte. Aus Aceton/Äther 33 mg Kristalle vom Smp. 256–262°. 25 mg Kristalle wurden dem  $\text{KMnO}_4$ -Abbau unterworfen (siehe z. B. [5]), wobei 19 mg saure Anteile gewonnen werden konnten, die man mit ätherischem Diazomethan methylierte und auf DC. (0,5 mm, System Chloroform/Äthanol 19:1, 2mal entwickelt) auf trennte. Die aus der Hauptzone eluierte Substanz war nach DC. (siehe oben) einheitlich und gab aus Aceton/Äther 6 mg Prismen vom Smp. 245–250°, die nach Misch-DC. und Misch-Smp. identisch mit *3β-Acetoxy-14-hydroxy-15-oxo-5β,14α-ätiensäure-methylester* [4] waren.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *H. O. Linde-Tempel*, Helv. **53**, 2188 (1970).
- [2] *N. Höriger, H. H. A. Linde & K. Meyer*, Helv. **52**, 1097 (1969) und frühere Mitt.
- [3] *P. Hofer, H. Linde & K. Meyer*, Helv. **43**, 1955 (1960).
- [4] *H. Linde & K. Meyer*, Helv. **42**, 807 (1959).
- [5] *K. Meyer*, Helv. **32**, 1238 (1949).
- [6] *K. Meyer*, Helv. **32**, 1993 (1949).
- [7] *E. Iseli, M. Kotake, E. Weiss & T. Reichstein*, Helv. **48**, 1093 (1965).
- [8] *J. P. Ruckstuhl & K. Meyer*, Helv. **40**, 1270 (1957).
- [9] *P. Hofer, H. Linde & K. Meyer*, Helv. **43**, 1950 (1960).
- [10] *H. Linde, P. Hofer & K. Meyer*, Helv. **49**, 1234 (1966).
- [11] *H. Schröter, Ch. Tamm & T. Reichstein*, Helv. **41**, 720 (1958).
- [12] *F. Bernoulli, H. Linde & K. Meyer*, Helv. **45**, 240 (1962).
- [13] *H. H. A. Linde & K. Meyer*, *Pharmacognosy and Phytochemistry*, (Ed. *H. Wagner & L. Hörhammer*) Springer-Verlag, Berlin u.a. 1971, pag. 239.
- [14] *R. Zürcher*, Helv. **46**, 2054 (1963).
- [15] *N. S. Bhacca & D. H. Williams*, *Applications of NMR. Spectroscopy in Organic Chemistry*, Holden-Day, Inc., San Francisco u.a. 1964; *L. Gsell & Ch. Tamm*, Helv. **52**, 551 (1969).
- [16] *A. J. Scott*, *Ultraviolet Spectra of Natural Products*, Pergamon Press, Oxford u.a. 1964, pag. 60ff.
- [17] *F. Sondheimer, W. Mc.Crae & W. G. Salmond*, J. Amer. chem. Soc. **91**, 1228 (1969).
- [18] *Houben-Weyl*, *Methoden der organischen Chemie*, VI/4, 665 (1966).
- [19] *A. v. Wartburg, J. Birkert & E. Angliker*, Helv. **45**, 2139 (1962).
- [20] *K. Meyer*, Helv. **32**, 1593 (1949); *St. Pataki & K. Meyer*, Helv. **38**, 631 (1955).
- [21] *N. Höriger*, Dissertation Basel 1971.
- [22] *N. Höriger, H. H. A. Linde & K. Meyer*, Helv. **53**, 1503 (1970).
- [23] *N. Höriger, D. Živanov, H. H. A. Linde & K. Meyer*, Helv. **53**, 2051 (1970).
- [24] *K. Bowden, J. M. Heilbron, E. R. H. Jones & B. C. L. Weedon*, J. chem. Soc. **1946**, 39.
- [25] *Y. Kamano, H. Yamamoto, Y. Tanaka & M. Komatsu*, *Tetrahedron Letters* **1968**, 5673; *N. Höriger, D. Živanov, H. H. A. Linde & K. Meyer*, Helv. **53**, 1993 (1970).