

Über die Wirkstoffe des Crotonöls, IX¹

Partialsynthese von Wirkstoffen des Crotonöls

HORST BRESCH, GERT KREIBICH, HUGO KUBINYI*, HANS-U. SCHAIRER,
HEINZ W. THIELMANN UND ERICH HECKER

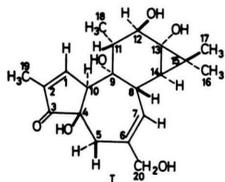
Biochemisches Institut des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg

(Z. Naturforsch. 23 b, 538—546 [1968]; eingegangen am 7. August 1967)

Herrn Prof. Dr. A. BUTENANDT in dankbarer Verehrung zum 65. Geburtstag gewidmet

Partial syntheses of mixed functional phorbol-(12,13)-diesters with acetic acid and long-chain fatty acids at the α -glycol group of phorbol are described. Six of the phorbol diesters synthesized are identical with the irritant and tumorpromoting acetyl-phorbol-acylates A₁—A₄, B₄ and B₇ isolated from croton oil. The isomeric phorbol-(12,13)-diesters A₂ and B₇ as well as A₃ and B₄ are pairs of positional isomers regarding the fatty acid residues. It may be generalized for all the eleven phorbol-(12,13)-diesters isolated so far from croton oil that compounds of the A group carry the long-chain fatty acid residue at C-13 and the short chain fatty acid residue at C-12. Compounds of the B group show inverse positions of these fatty acid residues. Isomeric phorbol-diester of the types A and B may be differentiated by their *R_f* values in thin layer chromatography, their IR and mass spectra as well as the melting points of their 20-[4'-nitrophenylazo-benzoic acid-(4)]-esters. Via the synthetic routes described phorbol-(12,13)-diesters with defined chemical structure are now easily accessible.

Die elf bisher aus Crotonöl isolierten entzündlichen und tumorpromovierenden Wirkstoffe sind Diester des Diterpens Phorbol mit je einer kurz- und einer langkettigen Fettsäure¹⁻⁴. Für Phorbol haben wir die Struktur eines 4.9.12.13.20-Pentahydroxytygliadien-(1.6)-ons-(3) (I)** vorgeschlagen^{5, 6}. Sie ist kürzlich auch hinsichtlich der relativen Konfiguration durch Röntgenstruktur-Analyse bestätigt^{7, 8} und durch die absolute Konfiguration⁸ erweitert worden.



Die primär-allylische Hydroxylgruppe an C₂₀ des Phorbols liegt in allen bisher aus Crotonöl isolierten Wirkstoffen frei vor¹⁻⁴. Die beiden Säurereste wurden am sekundären Hydroxyl an C-12 sowie am tertiären Cyclopropan-Hydroxyl an C-13 vermutet^{1, 8a}, die die α -Glykolgruppe des Phorbols (I) bilden. Um die angenommene Stellung der Fettsäurereste in den isolierten Wirkstoffen zu überprüfen, werden im folgenden Partialsynthesen von Phorbolestern untersucht, die als kurzkettige Säurekomponente Essigsäure und als langkettige Säurekomponente verschiedene unverzweigte, gesättigte Fettsäuren enthalten. Über einen Teil der Versuche ist bereits kurz berichtet worden^{*, 8a}.

Zur spezifischen und strukturbeweisenden Synthese der Wirkstoffe muß die primäre Hydroxyl-

¹ VIII. Mitt.: E. HECKER u. H. U. SCHAIRER, Z. Krebsforsch. 70, 1 [1967].

* Auszugsweise vorgetragen auf dem European Cancer Meeting, 3.—5. Juli 1967, in Wien.

** Die Natur der Sauerstofffunktionen des Phorbols war bereits vor der Konstitution seines Kohlenstoffskeletts bekannt. Sie wurde daher in früheren Mitteilungen zunächst mit Buchstaben bezeichnet (vgl. z. B. I. c. ⁵).

² E. HECKER u. H. BRESCH, Z. Naturforsch. 20 b, 216 [1965].

³ E. HECKER u. H. KUBINYI, Z. Krebsforsch. 67, 176 [1965].

⁴ E. CLARKE u. E. HECKER, Z. Krebsforsch. 67, 192 [1965].

⁵ E. HECKER, Naturwissenschaften 54, 282 [1967].

⁶ E. HECKER, H. BARTSCH, H. BRESCH, M. GSWENDT, E. HÄRLE, G. KREIBICH, H. KUBINYI, H. U. SCHAIRER, CH. V. SZCZEPANSKI u. H. W. THIELMANN, Tetrahedron Letters [London] 1967, 3165.

⁷ R. C. PETERSEN u. G. FERGUSON sowie L. CROMBIE, M. L. GAMES u. D. J. POINTER, Chem. Commun. 1967, 716.

⁸ W. HOPPE, F. BRANDL, I. STRELL, M. RÖHRL u. J. GASSMANN sowie E. HECKER, H. BARTSCH, G. KREIBICH u. CH. V. SZCZEPANSKI, Angew. Chem. 79, 824 [1967]; Angew. Chem. internat. Edit. 6, 809 [1967].

^{8a} E. HECKER, H. KUBINYI, H. U. SCHAIRER, CH. V. SZCZEPANSKI u. H. BRESCH, Angew. Chem. 77, 1076 [1965]; Angew. Chem. internat. Edit. 4, 1072 [1965]; die dort verwendete Numerierung der Hydroxylgruppen des Phorbols bezieht sich auf deren Stellung im ersten, inzwischen zu I revidierten (vgl. I. c. ^{5, 6}) Strukturvorschlag.

gruppe des Phorbols derart geschützt werden, daß sie nach Acylierung der beiden Glykolhydroxyle selektiv freigesetzt werden kann. Dazu bieten sich folgende methodische Möglichkeiten an:

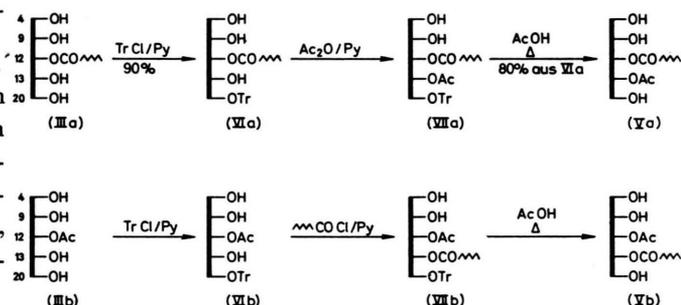
Acylierung und selektive Verseifung: Durch Umsetzung von Phorbol mit einem Überschuß von Acetanhydrid bzw. Acylchlorid in Pyridin erhält man in guten Ausbeuten 12.13.20-Triacylate, die sich mit Perchlorsäure in Methanol⁹ selektiv zu 12.13-Diacylaten, mit Natriummethylat in absolutem Methanol⁹ zu 12-Monoacylaten umestern lassen.

Alkylierung und Ätherspaltung: Umsetzung von Phorbol mit einem Überschuß von Tritylchlorid in Pyridin liefert in guten Ausbeuten den Phorbol-(20)-trityläther. Durch Acylierung in Pyridin werden 12.13-Di-*O*-acyl-phorbol-20-trityläther erhalten, die sich durch Erhitzen mit Eisessig in die 12.13-Diester überführen lassen.

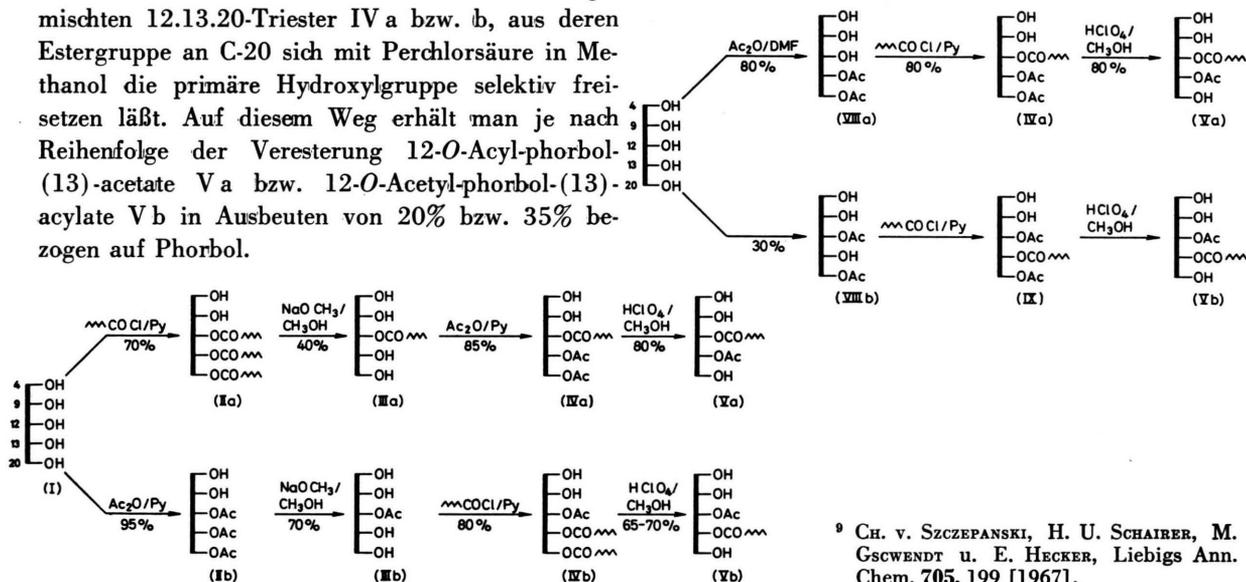
Unter Anwendung dieser Methoden werden zur Darstellung der Wirkstoffe aus Phorbol drei Wege beschritten.

Der erste Weg geht von Phorbol (I, vgl. Formelschema) aus, das mit Säurechlorid oder Acetanhydrid in Pyridin in die 12.13.20-Triester II a bzw. b überführt wird. Diese lassen sich mit Natriummethylat in absolutem Methanol zu den 12-Monoestern III a bzw. b umestern. Acylierung der 12-Monoester mit der zweiten Säure liefert die gemischten 12.13.20-Triester IV a bzw. b, aus deren Estergruppe an C-20 sich mit Perchlorsäure in Methanol die primäre Hydroxylgruppe selektiv freisetzen läßt. Auf diesem Weg erhält man je nach Reihenfolge der Veresterung 12-*O*-Acyl-phorbol-(13)-acetate V a bzw. 12-*O*-Acetyl-phorbol-(13)-acylate V b in Ausbeuten von 20% bzw. 35% bezogen auf Phorbol.

Der zweite Weg stellt eine Modifizierung des ersten Weges dar: auf der Stufe der 12-Monoester III a bzw. III b wird die primäre Hydroxylgruppe durch Tritylierung geschützt (VI a bzw. b). Die Trityläther werden mit der zweiten Säure zu VII a bzw. b verestert und dann der Tritylrest durch Kochen mit Eisessig abgespalten. Dieser Weg wird ebenfalls zur Synthese von 12-*O*-Acyl-phorbol-(13)-acetaten V a beschritten und liefert 20% Ausbeute bezogen auf Phorbol.



Der dritte Weg geht von den Phorbol-(13.20)- bzw. (12.20)-diacetaten VIII a bzw. VIII b aus, deren Darstellung bereits beschrieben wurde⁹. Veresterung dieser Diacetate mit langkettigen Säurechloriden liefert die gemischten Triester I a und IX, die sich mit Perchlorsäure in Methanol zu den 12.13-Diestern V a bzw. b umestern lassen. Dieser Weg wird zur Synthese von 12-*O*-Acyl-phorbol-(13)-acetaten V a beschritten, die in Ausbeuten von 50% bezogen auf Phorbol entstehen.



⁹ CH. V. SZCZEPANSKI, H. U. SCHAIRER, M. GSCWENDT u. E. HECKER, Liebigs Ann. Chem. 705, 199 [1967].

Versuche zur Synthese der Wirkstoffe durch direkte Umsetzung von Phorbol mit einem Äquivalent Acetanhydrid und danach mit einem Äquivalent langkettigem Säurechlorid müssen — entsprechend den abgestuften Veresterungsgeschwindigkeiten der Hydroxylgruppen⁹ — zur Bildung eines komplexen Gemisches führen. Es sollte neben den vier möglichen 12.13-Diestern, nämlich Phorbol-(12.13)-diacetat, 12-*O*-Acetylphorbol-(13)-acylat, 12-*O*-Acylphorbol-(13)-acetat und Phorbol-(12.13)-diacylat vor allem aus den in wesentlich größeren Mengen zu erwartenden isomeren 12.20- und 13.20-Diestern sowie den Tri- und Monoestern des Phorbols bestehen. Die Abtrennung eines einzelnen gemischten 12.13-Diesters aus einem solchen Ansatz erscheint kaum möglich. Trotzdem ist kürzlich berichtet worden¹⁰, daß auf diesem Wege mit Acetanhydrid und Myristoylchlorid eine Substanz erhalten wurde, die mit dem aus Crotonöl isolierten Wirkstoff C-3¹⁰ bzw. C¹¹ identisch sein und auch biologische Aktivität¹¹ zeigen soll.

Die bisher dargestellten Substanzen des Typs V a und b (Tab. 1, vgl. auch loc. cit.^{8a}) sind farblose Harze, die — mit einer Ausnahme — nicht kristallin erhalten werden konnten*. Bei der Umsetzung mit 4'-Nitroazobenzolcarbonsäure-(4)-chlorid¹² erhält man jedoch kristalline 20-NABS-Ester (Tab. 1).

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, zeigen die Isomerenpaare vom Typus V a bzw. V b, die sich nur durch die Stellung der Säurereste unterscheiden, signifikante Unterschiede in ihren *R_f*-Werten und in den Schmelzpunkten ihrer 20-NABS-Ester. Beide Kriterien können zur Unterscheidung herangezogen werden, wenn bei natürlich vorkommenden Wirkstoffen die Frage zu klären ist, welchem Typus sie angehören^{5, 8a}.

Weiterhin zeigen die jeweiligen stellungsisomeren Ester deutliche Unterschiede in den IR-Spektren^{8a}: während die Ester vom Typus V a nur eine breite Bande bei 1710 cm⁻¹ erkennen lassen (Abb. 1), findet man bei den Estern vom Typus V b zwei Carbonylbanden bei 1736 und 1705 cm⁻¹. Außerdem finden sich noch charakteristische Unterschiede im Gebiet zwischen 1300 und 800 cm⁻¹ (Abb. 1). Die festgestellten Unterschiede sind sowohl bei Messung in KBr als auch in Methylenchlorid zu erkennen. Hingegen unterscheiden sich die homologen Substanzen eines Isomerentyps in ihren IR-Spektren nur unwesentlich.

Die UV- und KMR-Spektren stellungsisomerer Ester sind identisch und lassen keine Zuordnung zum Typus V a bzw. V b zu.

Auch die Elektronenstoß-Massenspektren eignen sich zur eindeutigen Zuordnung isomerer Phorbol-(12.13)-diester: Aus dem Molekülion der Ester wird diejenige Säure, die mit der sekundären Hydroxylgruppe verestert ist, als *Acyloxyradikal*, diejenige Säure, die mit der tertiären Cyclopropanhydroxylgruppe verestert ist, als *ungeladenes Säuremolekül* abgespalten. Dies ist aus dem Fragmentierungsschema Abb. 2 zu ersehen.

Beispielsweise treten aus dem Molekülion von 12-*O*-*n*-Dekanoylphorbol-(13)-acetat (Typ V a, *n* = 8) 171 Masseneinheiten aus, d. h. ein Dekanoxyradikal, aus dem des 12-*O*-Acetylphorbol-(13)-*n*-dekanoat (Typ V b, *n* = 8) 172 Masseneinheiten, d. h. ein Dekansäuremolekül. Dementsprechend werden aus dem Molekülion von 12-*O*-*n*-Dekanoylphorbol-(13)-acetat 60 Masseneinheiten, d. h. ein Essigsäuremolekül, aus dem von 12-*O*-

Typus	Substanz	<i>R_f</i> -Wert*	[α] _D ²⁰ **	20-NABS-Ester, Schmp. [°C]
V a	12- <i>O</i> - <i>n</i> -Hexanoyl-	—	—	—
	12- <i>O</i> - <i>n</i> -Oktanoyl-	—	—	—
	12- <i>O</i> - <i>n</i> -Dekanoyl-	0,30	60°	88—90***
	12- <i>O</i> - <i>n</i> -Dodekanoyl-	0,32	53°	85—87***
	12- <i>O</i> - <i>n</i> -Tetradekanoyl-	0,33	47°	85—87
	12- <i>O</i> - <i>n</i> -Hexadekanoyl-	0,33	—	—
V b	12- <i>O</i> - <i>n</i> -Oktadekanoyl-	—	—	—
	12- <i>O</i> -Acetylphorbol-(13)- <i>n</i> -dekanoat	0,37	47°	147—149
	12- <i>O</i> -Acetylphorbol-(13)- <i>n</i> -dodekanoat	0,40	48°	147—149
	12- <i>O</i> -Acetylphorbol-(13)- <i>n</i> -tetradekanoat	0,41	44°	146—148

Tab. 1. Daten der dargestellten Phorbol-(12.13)-diester und ihrer 20-NABS-Ester. * Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel HF₂₅₄ (Merck) im System CH₂Cl₂/Aceton = 3/1, Kammersättigung. ** 1-proz. in Dioxan. *** Karminrote Modifikation.

¹⁰ E. R. ARROYO u. J. HOLCOMB, Chem. Ind. **1965**, 350; J. med. Chem. **8**, 672 [1965].

¹¹ B. L. VAN DUUREN u. L. ORRIS, Cancer Res. **25**, 1871 [1965].

¹² E. HECKER, Chem. Ber. **88**, 1666 [1955].

* Es ist bisher lediglich gelungen, das 12-*O*-Tetradekanoylphorbol-(13)-acetat (Wirkstoff A₁) zur Kristallisation zu bringen (vgl. l. c.^{1, 10} sowie diese Mitteilung, Beschreibung der Versuche).

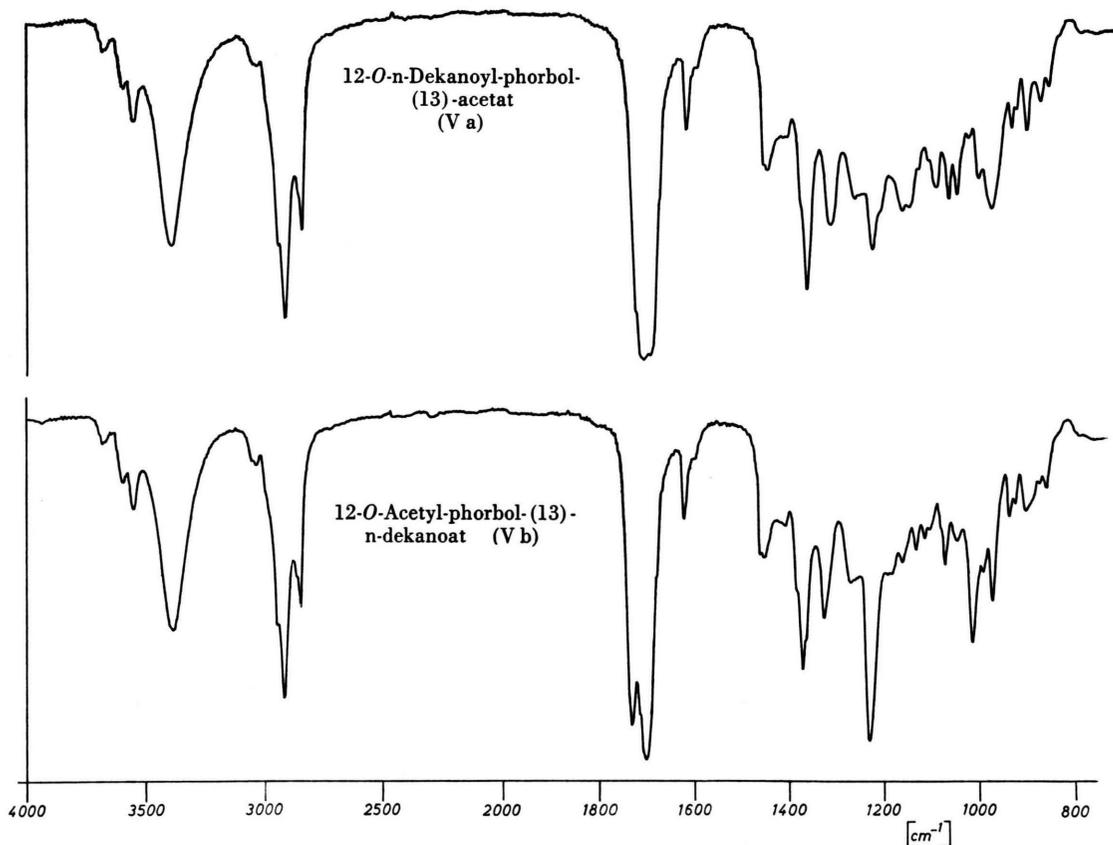


Abb. 1. IR-Spektren von 12-O-n-Dekanoyl-phorbol-(13)-acetat (V a) und 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-n-dekanoat (V b) in CH₂Cl₂.

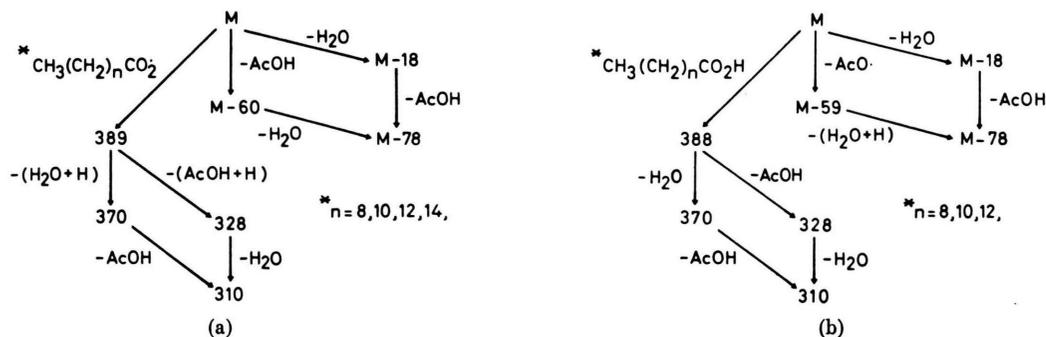


Abb. 2. Allgemeines Fragmentierungsschema der Molekülonen vom Typus V a (a) bzw. V b (b) in der Elektronenstoß-Massenspektrometrie.

Acetyl-phorbol-(13)-n-dekanoat 59 Masseneinheiten, d. h. ein Acetoxyradikal abgespalten. Im Elektronenstoß-Massenspektrum der 12-O-Acyl-phorbol-(13)-acetate findet man entsprechend die Massenspitzen der Fragmentionen $m/e=389$ und $m/e=M-60$, in dem der 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-acylate die Massenspitzen der Fragmentionen $m/e=388$ und $m/e=M-59$. Im Zuge der weiteren Fragmentierung verlieren die Fragmentionen, die aus dem Molekülion durch Abspaltung

eines Acyloxyradikals entstehen, 19 ($H_2O + H$) bzw. 61 ($AcOH + H$) Masseneinheiten. Damit werden bei beiden Stellungsisomeren die gleichen geradzahigen Fragmentionen 370, 328, 310 und M-78 erhalten.

Auf Grund der Massenspektren kann also – zumindest für diese Estertypen – leicht und eindeutig erkannt werden, mit welcher der beiden Säuren die Hydroxylgruppe an C-12 bzw. C-13 verestert ist.

Substanz	veresterte Säuren in 12, 13-Position	R_f -Wert*	$[\alpha]_D^{20}$ **	NABS-Ester Schmp. [°C]	Typus (Kriterium)
A ₁	n-Tetradekansäure, Essigsäure	0,33	49°	86–87°	Va (IR, MS)***
A ₂	n-Dekansäure, Essigsäure	0,30	—	—	Va (IR, MS)
A ₃	n-Dodekansäure, Essigsäure	0,32	—	—	Va (IR, MS)
A ₄	n-Hexadekansäure, Essigsäure	0,33	—	—	Va (IR, MS)
B ₄	Essigsäure, n-Dodekansäure	0,40	45°	150–152°	Vb (IR)
B ₇	Essigsäure, n-Dekansäure	0,37	48°	148–150°	Vb (IR)
B ₅	2-Methyl-buttersäure, n-Oktansäure	—	—	—	Vb (MS)
B ₆	Tiglinsäure, n-Oktansäure	—	—	—	Vb (MS)

Tab. 2. Daten der aus Crotonöl isolierten Wirkstoffe A₁, A₂, A₃, A₄, B₄, B₇, B₅ und B₆. * Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel (Merck) HF₂₅₄ im System CH₂Cl₂/Aceton = 3/1, Kammersättigung. ** 1-proz. in Dioxan. *** IR = Infrarot-Spektrometrie, MS = Massenspektrometrie.

Die Identifizierung der Acetylreste enthaltenden Wirkstoffe A₁, A₂, A₃, A₄, B₄ und B₇ aus Crotonöl mit den entsprechenden synthetisierten Phorbol-(12.13)-diestern der Reihen Va und b liefert mit Hilfe der eben genannten Kriterien ein eindeutiges Ergebnis (Tab. 2): die Substanzen A₁–A₄ sind 12-O-Acyl-phorbol-(13)-acetate vom Typus Va, B₄ und B₇ sind dagegen 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-acylate vom Typus Vb.

Während die Wirkstoffe B₄ und B₇ als kurzkettenige Säurekomponente Essigsäure enthalten, liegen in den übrigen 5 isolierten Wirkstoffen der B-Gruppe neben der langkettigen Säurekomponente entweder 2-Methylbuttersäure (B₁, B₂ und B₅) oder Tiglinsäure (B₃ und B₆) vor^{3,4}. Das Elektronenstoß-Massenspektrum der Wirkstoffe B₅ und B₆ ergibt ein Fragmentation hoher Intensität mit $m/e = 473$. Es entsteht aus dem Molekülion von B₅ bzw. von B₆ durch Abspaltung der Masse 101 bzw. 99. Das bedeutet, daß die 2-Methylbuttersäure (MG = 102) bzw. Tiglinsäure (MG = 100) als Acyloxyradikale abgespalten werden. In beiden Wirkstoffen ist demnach die kürzere Fettsäure mit der Hydroxylgruppe an C-12 verestert. Im Massenspektrum von B₅ findet man ein weiteres Fragmentation bei $m/e = 430$, im Falle von B₆ ein entsprechendes bei $m/e = 428$. Diese Massenspitzen entstehen jeweils durch Abspaltung der n-Oktansäure (MG = 144) aus dem Molekülion. Somit handelt es sich bei Wirkstoff B₅ um 12-O-[2-Methylbutyryl]-phorbol-(13)-n-oktanoat und bei B₆ um 12-O-Tiglyl-phorbol-(13)-n-oktanoat (Tab. 2).

Damit ist am Beispiel von insgesamt 8 isolierten Wirkstoffen (Tab. 2) gezeigt, daß die durch den R_f -Wert unterschiedenen Substanzgruppen A bzw. B dem Typus Va (A) bzw. dem Typus Vb (B) angehören. Es ist wahrscheinlich, daß die drei bezüglich der Stellungsisomerie der Estergruppen noch nicht zugeordneten Wirkstoffe B₁, B₂ und B₃ – von denen keine Substanzproben mehr vorlagen – ebenfalls dieser Regel folgen. B₁ wäre somit als ein 12-O-[2-Methylbutyryl]-phorbol-(13)-n-dodekanoat, B₂ als ein 12-O-[2-Methylbutyryl]-phorbol-(13)-n-dekanoat und B₃ als ein 12-O-Aiglyl-phorbol-(13)-n-dekanoat anzusprechen^{5,13}.

Auf dieselbe Weise wurden die von VAN DUUREN und ORRIS¹¹ aus Crotonöl isolierten Substanzen A und C, R_f -Wert 0,3 bzw. 0,21 (Benzol/Essigester = 1/1), identifiziert*. Substanz C besteht im wesentlichen aus 12-O-n-Tetradekanoyl-phorbol-(13)-acetat, ist also identisch mit Wirkstoff A₁^{1,2}. Substanz A erwies sich als Gemisch von 4 Phorbolestern des Typus Vb, nämlich B₁, B₂, B₄, B₇, mit geringeren Mengen des Wirkstoffs A₁.

Die gezielte Partialsynthese** der Wirkstoffe A₁ bis A₄, B₄ und B₇ des Crotonöls läßt somit sowohl das Auftreten der zwei Wirkstoffgruppen A und B^{1,14}, als auch der Isomerenpaare A₂ und B₇ bzw. A₃ und B₄^{1,5,13} verstehen. Entsprechend der Konfiguration der α -Glykolgruppe des Phorbols (I)^{6,8} stehen die beiden Acyloxyreste in *trans*-Stellung. Die Position der beiden Säurereste hat dabei offenbar einen größeren Einfluß auf den dünnschichtchromatographischen R_f -Wert als die sehr unterschiedliche Kettenlänge der Säurereste innerhalb der Wirkstoffgruppen

¹³ H. BARTSCH, H. BRESCH, M. GSCHWENDT, E. HÄRLE, G. KREIBICH, H. KUBINYI, H. U. SCHAIRER, CH. V. SZCZEPANSKI, H. W. THIELMANN U. E. HECKER, Z. analyt. Chem. **221**, 424 [1966].

* Proben der Substanzen wurden uns von Dr. VAN DUUREN, New York, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

** Wegen der zahlreichen Anfragen um reine Wirkstoffe aus Crotonöl haben wir die Firma Dr. Th. Schuchardt, 8000 München 80, Gaisbergstr. 1–3, dafür gewonnen, Darstellung und Vertrieb des reinen kristallisierten Wirkstoffs A₁ zu übernehmen.

¹⁴ E. HECKER, H. JARCZYK, J. G. MEYER, H. BRESCH U. I. BRACHMANN, Z. Krebsforsch. **66**, 478 [1965].

A bzw. B. — Über die biologische Wirkung der synthetisierten natürlichen Wirkstoffe sowie der übrigen homologen Phorbol-(12.13)-diester mit gemischten Esterfunktionen wird an anderer Stelle berichtet.

Mikroanalysen verdanken wir Herrn Dr. H. REIMLINGER, Brüssel, KMR-Messungen Frl. G. SCHILD und Herrn Dr. J. SONNENBICHLER, München, sowie Herrn Dr. A. MANNSCHRECK, Heidelberg. Für die Messung von Elektronenstoß-Massenspektren danken wir den Herren Dr. C. WÜNSCHE, Heidelberg, Dr. H. BUDZIKIEWICZ und Dipl.Chem. v. D. HAAR, Braunschweig.

Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte sind auf dem Kofler-Schmelzpunktmikroskop bestimmt und nicht korrigiert. Analysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Heidelberg ausgeführt.

Die UV-Spektren sind — wenn nicht anders angegeben — mit einem Beckman-Spektralphotometer DK-2 A in Methanol, die IR-Spektren mit einem Perkin-Elmer-IR-Spektralphotometer Modell 521 in KBr gemessen. Die Bestimmung der optischen Aktivität erfolgte im Kreispolariometer der Firma Zeiss-Winkel bzw. im lichtelektrischen Polarimeter der Firma Zeiss Type I. Zur Aufnahme der KMR-Spektren diente ein Kernresonanzspektrograph Modell A 60 der Firma Varian Associates. Als Standard wurde Tetramethylsilan ($\delta = 0,00$ ppm) verwendet. Massenspektren wurden mit dem Gerät CH-4 der Firma Fiedr. Krupp, MAT, Bremen, bzw. der MSg der AEI Manchester gemessen.

Zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel 0,05 bis 0,20 mm der Firma E. Merck verwendet. Dünnschichtchromatogramme wurden auf Kieselgel HF₂₅₄ Merck, 250 μ Schichtdicke, durchgeführt.

Die hohe biologische Wirksamkeit der Phorbolester macht sauberes Arbeiten zu einer zwingenden Notwendigkeit, um Entzündungen der Haut und der Schleimhäute zu vermeiden. Nach Kontakt mit den entzündlichen Estern hat sich rasches Spülen mit viel Aceton bewährt. Wo dies nicht möglich ist, wie etwa an den Augen, hilft eine Salbe auf Nebennierenrindenhormon-Grundlage, z. B. Hydrocortison Augensalbe 2,5 Prozent.

Phorbol-(12.13.20)triacylate (IIa): Als Beispiel wird die Darstellung von Phorbol-(12.13.20)-tri-n-hexa-

dekanoat beschrieben. 4,0 g Phorbol (11 mMol) werden in 50 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und unter Eiskühlung und Rühren mit 18,1 g n-Hexadecanoylchlorid (66 mMol) versetzt. Das Fortschreiten der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 18–24 Stdn. wird die Reaktion abgebrochen, indem man das Reaktionsgemisch in Wasser gießt und mit Methylchlorid erschöpfend extrahiert. Die organische Phase wird mit 1-n. Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion der Wasserphase extrahiert. Anschließend wird mit Wasser entsäuert, mit 5-proz. Kaliumbicarbonat-Lösung wiederholt gewaschen und zuletzt mit Wasser geschüttelt. Die Methylchlorid-Lösung wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. 8,9 g Phorbol-(12.13.20)-tri-n-hexadekanoat, II a (75% d. Th.).

Unter denselben Bedingungen werden (Tab. 3) Phorbol-(12.13.20)-tri-n-hexanoat, -n-oktanoat, -n-dekanoat, -n-dodekanoat, -n-tetradekanoat in 65–75-proz. Ausbeute erhalten. Die Substanzen sind zähe Öle, die bisher nicht kristallisiert werden konnten.

Die IR-Spektren in CCl₄ zeigen folgende gemeinsame Banden: ν_{OH} 3560 cm⁻¹, 3400 cm⁻¹; ν_{CH} 2915, 2845 cm⁻¹; $\nu_{C=O}$ 1730, 1704 cm⁻¹; $\nu_{C=C}$ 1625 cm⁻¹.

KMR-Spektren in CCl₄: OH austauschbar bei 5,3 und 3,5 ppm; —(CH₂)_n— bei 1,3 ppm; H-20 bei 4,5 ppm; H-12 bei 5,3 ppm.

Phorbol-(12)-monoacylate (III a): 4,2 g Phorbol-(12.13.20)-tri-n-hexadekanoat werden in 50 ml absolutem Dioxan gelöst und mit 500 ml absolutem Methanol und 3 ml einer 1-proz. methanolischen Natriummethylat-Lösung bei Raumtemperatur stengelassen. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 48 Stdn. wird die Reaktion mit 2 ml Eisessig gestoppt, das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand an Kieselgel/13% H₂O mit Essigester chromatographiert. Man erhält 0,95 g Phorbol-(12)-n-hexadekanoat, III a (40% d. Th.), als farbloses Harz, R_f-Wert mit Essigester als Laufmittel: 0,5. Unter denselben Bedingungen wurde Phorbol-(12)-n-tetradekanoat dargestellt.

12-O-Acyl-phorbol-(13.20)-diacetat (IV a) aus Phorbol-(12)-monoacylat (III a): 0,95 g Phorbol-(12)-n-hexadekanoat (III a)^{8a} werden in 50 ml absolutem Pyridin gelöst, mit 2 ml Acetanhydrid versetzt und 60 Stdn. bei 8 °C stehen gelassen. Es wird wie üblich aufgearbeitet und über Kieselgel/13% H₂O mit Benzol/Essig-

Phorbol-(12.13.20)-triacylat	Bruttoformel	ϵ_{230}^*	$[\alpha]_D^{20} **$	R _f -Wert***	
-tri-n-hexanoat	C ₃₈ H ₅₈ O ₉ (658,9)	****	5660	47°	0,32
-tri-n-oktanoat	C ₄₄ H ₇₀ O ₉ (743,0)		5450	41°	0,38
-tri-n-dekanoat	C ₅₀ H ₈₂ O ₉ (827,2)		5620	37°	0,44
-tri-n-dodekanoat	C ₅₆ H ₉₄ O ₉ (911,4)		5350	34°	0,51
-tri-n-tetradekanoat	C ₆₂ H ₁₀₆ O ₉ (995,5)		5520	29°	0,53
-tri-n-hexadekanoat	C ₆₈ H ₁₁₈ O ₉ (1079,7)		5510	27°	0,54

Tab. 3. Daten der dargestellten Phorbol-(12.13.20)-triacylate II a. * in Cyclohexan, $\lambda_{max} = 230 m\mu$, ** berechnet; 1-proz. in Dioxan, *** in Benzol/Essigester = 10/1, ohne Kammersättigung. **** Mol.-Gew. massenspektrometrisch bestätigt.

12-O-Acyl-phorbol-(13)-acetate	Bruttoformel	ϵ_{233} *	$[\alpha]_D^{20}$ **	R_f -Wert***
12-O-n-Hexanoyl-	C ₂₈ H ₄₀ O ₈ (504,6)	5300	—	—
12-O-n-Oktanoyl-	C ₃₀ H ₄₄ O ₈ (532,7)	5250	—	—
12-O-n-Dekanoyl-	C ₃₂ H ₄₈ O ₈ (560,7) ****	5400	60°	0,30
12-O-n-Dodekanoyl-	C ₃₄ H ₅₂ O ₈ (588,8) ****	5570	53°	0,32
12-O-n-Tetradekanoyl-	C ₃₆ H ₅₆ O ₈ (616,8) ****	5170	47°	0,33
12-O-n-Hexadekanoyl-	C ₃₈ H ₆₀ O ₈ (644,9) ****	5430	—	0,33
12-O-n-Oktadekanoyl-	C ₄₀ H ₆₄ O ₈ (672,9)	5440	—	—

Tab. 4. Daten der dargestellten 12-O-Acyl-phorbol-(13)-acetate V a. * $\lambda_{\max} = 233 \text{ m}\mu$, in Methanol, ** 1-proz. in Dioxan, *** in CH₂Cl₂/Aceton = 3/1, Kammersättigung. **** Mol.-Gew. massenspektrometrisch bestätigt.

ester = 4/1 chromatographiert. Man erhält 0,93 g 12-O-n-Hexadekanoyl-phorbol-(13.20)-diacetat, IV a (87% d. Th.), als farbloses Harz. R_f -Wert 0,5 in Benzol/Esigester = 4/1.

12-O-Acyl-phorbol-(13)-acetat (V a): 0,93 g 12-O-n-Hexadekanoyl-phorbol-(13.20)-diacetat (IV a) werden in 100 ml Methanol gelöst und mit 0,25 ml 60-proz. Perchlorsäure 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es wird wie üblich aufgearbeitet und mit CHCl₃/EE = 3/2 an Kieselgel/13% H₂O chromatographiert. Man erhält 0,71 g 12-O-n-Hexadekanoyl-phorbol-(13)-acetat, V a (80% d. Th.) als farbloses Harz. Auf dem Weg IV a → V a wurden 12-O-n-Hexanoyl-, 12-O-n-Oktanoyl-, 12-O-n-Dekanoyl-, 12-O-n-Dodekanoyl-, 12-O-n-Tetradekanoyl- und 12-O-n-Oktadekanoyl-phorbol-(13)-acetat dargestellt (Tab. 4). Von diesen Verbindungen wurde das chromatographisch gereinigte 12-O-n-Tetradekanoyl-phorbol-13-acetat (Wirkstoff A₁) durch Craig-Verteilung über $n=1600$ Verteilungsschritte im System¹ Tetrachlorkohlenstoff (2), Methanol (1), Wasser (0,15), $V = 12:10$ hoch gereinigt. Nach Animpfen einer gesättigten Lösung der reinen Substanz in Aceton mit Spuren von kristallinem Phorbol-(12.13)-di-n-tetradekanoat kristallisierte A₁¹³ bei -30° aus, Schmelzpunkt nach einmaligem Umkristallisieren aus Aceton $67-70^\circ\text{C}$.

IR-Spektren in KBr: ν_{OH} 3410 cm⁻¹; ν_{CH} 2915, 2845 cm⁻¹; $\nu_{\text{C=O}}$ 1710 cm⁻¹; $\nu_{\text{C=C}}$ 1618 cm⁻¹.

KMR-Spektren in CDCl₃: OH austauschbar bei 2,5, 3,2 und 5,6 ppm; $-(\text{CH}_2)_n-$ bei 1,3 ppm; CH₃COO- bei 2,1 ppm; H-20 bei 4,0 ppm; H-12 bei 5,4 ppm.

12-O-Acetyl-phorbol-(13.20)-diacylate (IV b): 500 mg Phorbol-(12)-monoacetat III b⁹ werden in 15 ml absolutem Pyridin gelöst und auf -5°C abgekühlt. Dann werden unter Rühren a) 1,1 ml n-Dekanoylchlorid oder b) 1,3 ml n-Dodekanoylchlorid oder c) 1,5 ml n-Tetradekanoylchlorid zugegeben. Die Ansätze werden vier

Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend in 200 ml Eiswasser gegossen und wie üblich aufgearbeitet. Man zieht das Methylchlorid am Rotationsverdampfer ab und chromatographiert den Rückstand an 100 g Al₂O₃/10% H₂O. Elution mit CH₂Cl₂/CCl₄ liefert 80% d. Th. 12-O-Acetyl-phorbol-(13.20)-acylat, IV b. Die dargestellten Triester sind farblose Harze; sie wurden ohne weitere Charakterisierung zur nachfolgenden Reaktion verwendet.

12-O-Acetyl-phorbol-(13)-acylat (V b): Als Beispiel wird die Darstellung von 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-n-dodekanoat beschrieben. 750 mg 12-O-Acetyl-phorbol-(13.20)-di-n-dodekanoat (IV b) werden in 150 ml Methanol gelöst und mit 0,4 ml 60-proz. Perchlorsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 40 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen und die Umsetzung dünn-schichtchromatographisch verfolgt. Um die Reaktion zu beenden, werden 1,5 g NaOCOCH₃·3 H₂O zugesetzt; anschließend zieht man das Methanol am Rotationsverdampfer ab. Der Rückstand wird mit 100 ml Wasser versetzt, das Reaktionsprodukt in 100 ml Methylchlorid aufgenommen und die wäßrige Phase dreimal mit je 50 ml Methylchlorid ausgeschüttelt. Die vereinigten Methylchloridphasen werden mit 50 ml 5-proz. KHCO₃-Lösung, dann mit 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Methylchlorids wird der Rückstand an Kieselgel/13% H₂O chromatographiert. Die Elution mit CH₂Cl₂/Äther = 4/1 liefert 384 mg 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-n-dodekanoat, V b (67% d. Th.). Unter denselben Bedingungen werden 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-n-dekanoat und -(13)-n-tetradekanoat erhalten (Tab. 5). Die Substanzen konnten bisher nicht kristallisiert werden.

IR-Spektren in KBr: ν_{OH} 3410 cm⁻¹; ν_{CH} 2915 cm⁻¹, 2845 cm⁻¹; $\nu_{\text{C=O}}$ 1738 cm⁻¹, 1706 cm⁻¹; $\nu_{\text{C=C}}$ 1622 cm⁻¹.

12-O-Acetyl-phorbol-(13)-acylat	Bruttoformel	ϵ_{233} *	$[\alpha]_D^{20}$ **	R_f -Wert ***	
-(13)-n-dekanoat	C ₃₂ H ₄₈ O ₈ (560,7)	****	47°	0,37	
-(13)-n-dodekanoat	C ₃₄ H ₅₂ O ₈ (588,8)		5300	48°	0,40
-(13)-n-tetradekanoat	C ₃₆ H ₅₆ O ₈ (616,8)		5400	44°	0,41

Tab. 5. Daten der dargestellten 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-acylate V b. * in Äthanol $\lambda_{\max} = 233 \text{ m}\mu$; ** ca. 1-proz. in Dioxan; *** in CH₂Cl₂/Aceton = 3/1, Kammersättigung. **** Mol.-Gew. massenspektrometrisch bestätigt.

Daten	12-O-Acetyl-phorbol-(13)-acylat-(20)-NABS-ester	-(13)-n-dekanoat-	-(13)-n-dodekanoat-	-(13)-n-tetradekanoat-
Schmelzpunkt	147—149°	147—149°	146—148°	
Bruttoformel	C ₄₅ H ₅₅ O ₁₁ N ₃ (813,9)	C ₄₇ H ₅₉ O ₁₁ N ₃ (842,0)	C ₄₉ H ₆₃ O ₁₁ N ₃ (870,1)	
Analyse	ber. gef.	ber. gef.	ber. gef.	ber. gef.
C	66,39 66,19	67,16 66,97	67,64 67,48	
H	6,81 6,75	7,06 7,02	7,30 7,32	
N	5,16 5,31	4,99 5,16	4,83 5,00	
UV-Spektrum (in Äthanol)	332 mμ (30600)	332 mμ (30400)	332 mμ (30700)	

Tab. 6. Daten der dargestellten 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-acylat-(20)-NABS-ester.

KMR-Spektrum (in CCl₄): OH austauschbar bei 5,4 ppm, 4,2 ppm, 3,5 ppm; —(CH₂)_n— 1,3 ppm; CH₃COO—: 2,1 ppm; H-20 3,9 ppm; H-12 5,3 ppm.

12-O-Acetyl-phorbol-(13)-acylat-(20)-NABS-ester: 100 mg 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-n-dodekanoat (V b) werden in 5 ml Benzol gelöst, mit einer Lösung von 300 mg NABS-chlorid in 10 ml Benzol und mit 0,3 ml Pyridin versetzt und 4 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Benzol wird am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand mit 15 ml Aceton und 2 ml Wasser versetzt und 7 Stdn. gerührt. Es wird vom Festkörper abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingedampft. Den Rückstand schwemmt man mehrmals in CCl₄ auf, um möglichst allen NABS-ester zu lösen. Die Lösung wird auf 45 g Al₂O₃ der Aktivitätsstufe IV chromatographiert. Man eluiert zunächst mit Petroläther, dann nacheinander mit CCl₄, CCl₄/CH₂Cl₂ = 9/1, 4/1, 2/1, wobei zwei rote Verunreinigungen entfernt werden können, die aus dem NABS-chlorid stammen. Der NABS-ester von 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-n-dodekanoat wird mit CCl₄/CH₂Cl₂ = 1/1 eluiert; man erhält 137 mg (96% d. Th.). Das rote Harz wird in wenig Methylenchlorid aufgenommen und mit 3 ml Methanol versetzt. Durch vorsichtiges Erwärmen auf dem Wasserbad verdampft das Methylenchlorid; beim langsamen Abküh-

len der Lösung kristallisiert der NABS-ester in feinen, roten Nadeln. In entsprechender Weise werden die NABS-ester von 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-n-tetradekanoat und -(13)-n-dekanoat dargestellt (Tab. 6). — Gemische dieser NABS-ester geben keine Schmelzpunktsdepression.

IR-Spektren in KBr: ν_{OH} 3400 cm⁻¹; ν_{CH} 2920, 2845 cm⁻¹; ν_{C=O} 1714 cm⁻¹; ν_{C=C} 1620, 1600, 1586 cm⁻¹.

12-O-Acyl-phorbol-(13)-acetat-(20)-NABS-ester: Nach der oben angegebenen Vorschrift für 12-O-Acetyl-phorbol-(13)-acylate lassen sich auch aus den 12-O-Acyl-phorbol-(13)-acetaten die (20)-NABS-ester bereiten. Die rohen Ester werden auf Kieselgel/13% H₂O mit Benzol/Essigester = 10/1 chromatographiert und die erhaltenen roten Harze aus wenig Methanol kristallisiert. Man erhält uncharf schmelzende dunkelrote Kristalle, die beim Eintragen in wenige Tropfen Methanol sofort zu einem Öl zerfließen, das jedoch nach wenigen Sek. zu karminroten Kristallen erstarrt. Diese Modifikation liefert scharfe Schmelzpunkte (Tab. 7).

IR-Spektren in KBr: ν_{OH} 3400; ν_{CH} 2915, 2845 cm⁻¹; ν_{C=O} 1715 cm⁻¹; ν_{C=C} 1620, 1600, 1586 cm⁻¹.

12-O-Acyl-phorbol-(20)-trityläther (VI a): 2,5 g Phorbol-(12)-n-tetradekanoat (III a) werden in 100 ml absolutem Pyridin gelöst und mit 12,0 g Tritylchlorid

Daten	12-O-Acyl-phorbol-(13)-acetat-(20)-NABS-ester	12-O-n-Dekanoyl-	12-O-n-Dodekanoyl-	12-O-n-Tetradekanoyl
Schmelzpunkt	88—90°*	85—87°*	85—87°*	
Bruttoformel	C ₄₅ H ₅₅ O ₁₁ N ₃ (813,9)	C ₄₇ H ₅₉ O ₁₁ N ₃ (842,0)	C ₄₉ H ₆₃ O ₁₁ N ₃ (870,1)	
Analyse	ber. gef.	ber. gef.	ber. gef.	ber. gef.
C	66,39 66,32	67,16 67,17	67,64 67,72	
H	6,81 6,78	7,06 7,20	7,30 7,27	
N	5,16 5,17	4,99 5,28	4,83 5,21	
UV-Spektrum (in Methanol)	331 mμ (31600)	331 mμ (31800)	331 mμ (32200)	

Tab. 7. Daten der 12-O-Acyl-phorbol-(13)-acetat-(20)-NABS-ester. * Karminrote Modifikation.

versetzt. Nach 12 Stdn. wird das Pyridin im Hochvakuum abgezogen. Der Rückstand wird mit 250 ml Methylchlorid aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Nach Abrotieren des Lösungsmittels wird das Reaktionsgemisch auf Kieselgel/13% H₂O chromatographiert. Man eluiert zuerst mit Methylchlorid das Triphenylmethanol und dann mit Methylchlorid/Äther = 4/1. Es werden 3,2 g farbloser harziger 12-*O*-Tetradekanoyl-phorbol-(20)-trityläther (VI a) erhalten (90% d. Th.); *R_f*-Wert 0,38 im System Petroläther/Äther = 1/2, $[\alpha]_D^{26} = 16^\circ$.

IR-Spektrum in CCl₄: ν_{OH} 3570 cm⁻¹, 3345 cm⁻¹; ν_{CH} 2920, 2850 cm⁻¹; $\nu_{C=O}$ 1700 cm⁻¹; $\nu_{C=C}$ 1590 cm⁻¹.

UV-Spektrum in Methanol: λ_{max} 196,5, 252 (Schulter), 332 m μ ; ϵ_{max} 94000, 4000, 90.

12-*O*-Acyl-phorbol-(13)-acetat (V a) aus 12-*O*-Acyl-phorbol-(20)-trityläther (VI a) über 12-*O*-Acyl-phorbol-(13)-acetat-(20)-trityläther (VII a): Man löst 300 mg 12-*O*-n-Tetradekanoyl-phorbol-(20)-trityläther (VI a) in 3 ml absolutem Pyridin und gibt 0,6 ml Acetanhydrid zu. Nach 24 Stdn. entfernt man das Pyridin im Ölpumpenvakuum und spaltet den Tritylrest durch Erhitzen mit 20 ml Eisessig unter Stickstoff (15 Min., 100 °C) ab. Der Eisessig wird im Hochvakuum entfernt und der Rückstand auf Dickschichtplatten (200·400 mm, 1 mm Schichtdicke) mit Äther chromatographiert. Die Substanzzone wird abgeschabt und das Kieselgel auf einer G 4-Fritte mehrmals mit Methanol gewaschen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Methylchlorid aufgenommen und zur Entfernung von abgeschiedenem SiO₂ filtriert. Aus dem Filtrat erhält man 178 mg 12-*O*-n-Tetradekanoyl-phorbol-(13)-acetat, V a (80% d. Th.) als farbloses Harz.

12-*O*-Acyl-phorbol-(13.20)-diacetat (IV a) aus Phorbol-(13.20)-diacetat (VIII a): 4,0 g Phorbol-(13.20)-

diacetat (VIII a)⁹ werden in 30 ml absolutem Pyridin gelöst und unter Kühlung mit 8,0 g n-Tetradekanoylchlorid versetzt. Nach 12 Stdn. wird das Reaktionsgemisch in der üblichen Weise aufgearbeitet. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel/13% H₂O mit Petroläther/Äther = 3/1 erhält man 4,8 g harziges 12-*O*-n-Tetradekanoyl-phorbol-(13.20)-diacetat, IV a (81% d. Th.), *R_f*-Wert 0,47 in Methylchlorid/Aceton = 8/1.

Phorbol-(12)-acylat (III a) aus 12-*O*-Acyl-phorbol-(13.20)-diacetat (IV a): Man löst 4,0 g 12-*O*-n-Tetradekanoyl-phorbol-(13.20)-diacetat (IV a) in 600 ml absolutem Methanol und fügt 8 ml einer 0,5-proz. methanolischen Natriummethylat-Lösung zu. Nach 48 Stdn. stoppt man die Reaktion mit 3 ml Eisessig. Man entfernt das Lösungsmittel und chromatographiert den Rückstand auf Kieselgel/13% H₂O zuerst mit Äther, dann mit Äther/Methanol = 20/1. Es werden 2,75 g Phorbol-(12)-n-tetradekanoat III a (79% d. Th.) erhalten, *R_f*-Wert 0,19 im System Essigester/Chloroform = 5/1.

Elektronenstoß-Massenspektren der Wirkstoffe B₅ und B₆: Relative Intensitäten für *m/e* > 308 und *I* > 4% bezogen auf *m/e* = 310:

<i>m/e</i>	574; 474; 473; 472; 454; 430; 429; 413;
I%	5; 7; 22; 4; 6; 9; 4; 5;
<i>m/e</i>	412; 346; 345; 330; 329; 328; 313; 312;
I%	17; 6; 4; 5; 28; 95; 7; 8;
<i>m/e</i>	311; 310; 309; 308.
I%	38; 100; 16; 5.

Wirkstoff B₆:

<i>m/e</i>	572; 474; 473; 472; 454; 428; 410; 398;
I%	7; 6; 16; 4; 8; 6; 8; 6;
<i>m/e</i>	346; 345; 330; 329; 328; 327; 326; 313;
I%	5; 4; 4; 27; 93; 20; 6; 7;
<i>m/e</i>	312; 311; 310; 309; 308.
I%	8; 38; 100; 18; 4.