

by Mr. H. JOCKUSCH⁹ recently in this laboratory. The aggregation of the native proteins into TMV-like rods of varying length was also confirmed in the electron microscope.

The procedure has been further simplified by doing away with the dialysis and centrifugation steps. When TMV suspended in water or in a weak buffer is led directly into the electrophoresis chamber under otherwise identical conditions mentioned above, the virus disintegrates into its components and the products can be collected in the usual way. A typical run with vulgare is shown in Fig. 3. The protein fractions recovered satisfied the criteria of nativity. This simplified method, however, was only partially applicable to the strain A-14, from which it is difficult to obtain pure protein by the ammo-

num sulfate method^{9,10}. About 1/10 of the total nucleoprotein of A-14 applied could be recovered as moderately pure native protein with an E_{260}/E_{280} value of 0.66.

For many strains of TMV, the free flow electrophoresis promises to be the method of choice. It yields large quantities of native protein in a relatively short time.

My sincere thanks are due to Dr. H. G. WITTMANN, Director, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, for valuable discussions and to the "Deutsche Forschungsgemeinschaft" for financial aid in procuring the apparatus. The able technical assistance of Miss MONIKA NEUMANN and Mr. P. HEINRICH are also gratefully acknowledged.

⁹ H. JOCKUSCH, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **24**, 577 [1966].

¹⁰ H. G. WITTMANN, *Z. Vererbungslehre* **93**, 491 [1962].

Über die Wirkstoffe des Crotonöls, VII¹

Phorbol

ERICH HECKER, CHRISTOPH V. SZCZEPANSKI, HUGO KUBINYI, HORST BRESCH, ECKHART HÄRLE,
HANS ULRICH SCHAIRER und HELMUT BARTSCH

Max-Planck-Institut für Biochemie, München, und Biochemisches Institut
am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg

(*Z. Naturforsch.* **21 b**, 1204—1214 [1966]; eingegangen am 19. September 1966)

The preparation of phorbol $C_{20}H_{28}O_6$ from croton oil and of some functional derivatives is described. The six oxygen functions of phorbol are identified as five hydroxyl groups and one carbonyl group. Two C=C double bonds are part of primary allylalcoholic and α,β -unsaturated carbonyl groupings. The carbon skeleton contains four rings and the parent hydrocarbon is most probably of diterpene nature.

Die aus Crotonöl rein dargestellten toxisch, entzündlich und cocarcinogen hochaktiven Wirkstoffe A1 – A4²⁻⁴ und B1 – B7⁵⁻⁷ enthalten 8 Sauerstofffunktionen. 4 davon gehören zwei Estergruppen an: die wirksamen Naturstoffe sind Diester und enthalten jeweils einen kurz- und einen langkettigen Fett-

säurerest (I). 3 weitere Sauerstofffunktionen wurden als freie Hydroxylgruppen erkannt, von denen eine primär und allylständig ist. Die achte Sauerstofffunktion ist in einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe enthalten. Aus allen Wirkstoffen wird durch reduktive Esterspaltung mit $LiAlH_4$ die kristalline

¹ VI. Mitt.: *Z. Krebsforsch.* **68**, 366 [1966].

² E. HECKER, H. BRESCH u. CH. V. SZCZEPANSKI, *Angew. Chem.* **76**, 225 [1964]; *Angew. Chem. Internat. Edit.* **3**, 227 [1964]; E. HECKER u. H. BRESCH, *Z. Naturforsch.* **20 b**, 216 [1965].

³ H. KUBINYI u. E. HECKER, Analytikertagung Lindau 13. bis 16. April 1966; *Z. analyt. Chem.* **221**, 424 [1966].

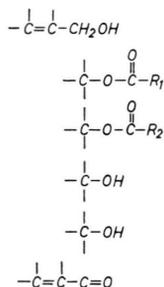
⁴ E. HECKER, 17. Mosbacher Kolloquium „Molekulare Biologie des malignen Wachstums“ 21.–23. April 1966, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1966, p. 105.

⁵ E. HECKER, H. KUBINYI u. H. BRESCH, *Angew. Chem.* **76**, 889 [1964]; *Angew. Chem. Internat. Edit.* **3**, 747 [1964]; E. HECKER u. H. KUBINYI, *Z. Krebsforsch.* **67**, 176 [1965].

⁶ E. HECKER, vorgetragen auf dem I. Weltfettkongreß, Hamburg 12.–18. Oktober 1964, Abstracts p. 176; vgl. E. HECKER, H. BRESCH u. J. G. MEYER, *Fette-Seifen-Anstrichmittel* **67**, 78 [1965].

⁷ E. CLARKE u. E. HECKER, *Naturwissenschaften* **52**, 446 [1965]; *Z. Krebsforsch.* **67**, 192 [1965].

Hexahydroxy-Verbindung $C_{20}H_{30}O_6$ erhalten, in der die Carbonylgruppe des Enonsystems unter Aufnahme von 2 Wasserstoffatomen reduziert ist. Gemeinsamer Grundkörper ist daher eine Verbindung $C_{20}H_{28}O_6$ (II), die als das zuerst von FLASCHENTRÄGER beschriebene „Phorbol“ erkannt wurde²⁻⁷.



I: R_1 bzw. R_2 : kurz- bzw. langkettige Fettsäurereste,
 II: $R_1=R_2=H$.

Kristallines Phorbol wurde bereits in den 20er Jahren aus Crotonöl durch alkalikatalysierte Methanolyse dargestellt^{8, 9}. FLASCHENTRÄGER und Mitarb. haben die Bruttoformel $C_{20}H_{28-30}O_6$ ermittelt^{10, 11}. Im Toxizitätstest an Fröschen^{2, 6, 8, 9, 12} und Kaninchen^{8, 9} ist Phorbol – im Gegensatz zu Crotonöl – unwirksam. Da sich jedoch ein acetyliertes Phorbol als toxisch erwies, vermuteten bereits BÖHM und FLASCHENTRÄGER eine Beziehung zwischen Phorbol und den natürlichen Wirkstoffen des Crotonöls^{8, 9}.

Wir konnten das wirksame Acetylphorbol als Triacetat identifizieren^{2, 6} und seine – im Vergleich zum Wirkstoff A1 jedoch geringe – Toxizität an Fröschen bestätigen. Außerdem wurde von uns auch eine schwache entzündliche und cocarcinogene Aktivität des Triacetates an der Maus nachgewiesen^{2, 6}. Mit der Partialsynthese einiger natürlicher Wirkstoffe des Crotonöls gelang kürzlich der endgültige Beweis, daß Phorbol der Grundkörper der Wirkstoffe ist¹³.

Darstellung und Charakterisierung von Phorbol

Zur Darstellung von Phorbol wird Crotonöl in Anlehnung an die in der Literatur angegebenen Vor-

schriften^{10, 11, 14} mit einer methanolischen Lösung von Bariumhydroxyd behandelt. Man erhält Phorbol aus äthanolischer Mutterlauge als farblose, lösungsmittelhaltige Kristalle, die unter Äthanol in der Kälte aufbewahrt längere Zeit haltbar sind. Die Ausbeute an „Alkoholphorbol“ beträgt im Mittel etwa 1 Gew.-% des eingesetzten Crotonöls. Sie liegt damit in derselben Größenordnung, in der die Wirkstoff-Fractionen A und B im systematischen Trennungsgang aus Crotonöl isoliert werden¹⁵.

Alkoholphorbol ist in Wasser bei Raumtemperatur zu 17 Gew.-% löslich. Erwärmt man die kalt gesättigte Lösung auf 60°, so bleiben nur 6 – 8 Gew.-% in Lösung – der Rest fällt als Lösungsmittel-freies „Wasserphorbol“* aus, das im Gegensatz zu Alkoholphorbol unverändert haltbar ist. Zur weiteren Reinigung muß aus wäßriger Lösung gewonnenes Phorbol wieder aus Alkohol kristallisiert werden¹⁶.

Phorbol ist sowohl sauerstoff- als auch säure- und alkaliempfindlich. Wird die Substanz mit 2-n. methanolischer KOH erwärmt und dann neutralisiert, so erhält man mit $FeCl_3$ eine deutliche Phenol- bzw. Enolreaktion. Die reduzierende Wirkung gegenüber Tollens-Reagenz, Fehlingscher Lösung sowie TILLMANN'S Reagenz^{10, 14} konnte bestätigt werden.

Die Charakterisierung von Phorbol und seinen Estern^{2, 5-7} ist durch die Neigung der Substanzen, Lösungsmittel einzuschließen, außerordentlich erschwert. Alkoholphorbol, das nach KMR-Daten 1 Mol Äthanol enthält, liefert z. B. Schmelzpunkte, die bei verschiedenen Präparaten zwischen 230 und 240° liegen, jedoch scharf innerhalb eines Temperaturintervalles von 2° schmelzen.

Das Ergebnis der *Elementaranalyse* von Phorbol (Ultramikromethode nach WALISCH¹⁷) läßt sich am besten mit der Bruttoformel $C_{20}H_{28}O_6$ vereinbaren. Die Bestimmung des Mol.-Gew. gelingt mit der schonenden Methode der *Elektronenanlagerungs-Massenspektrometrie* nach v. ARDENNE¹⁸ (Abb. 1). Neben dem Molekülion (m/e 364) treten – ähnlich wie bei den Wirkstoffen^{2, 7} – Fragmente auf, die sich durch die Abspaltung von einem, zwei und drei Mole-

⁸ B. FLASCHENTRÄGER, *Angew. Chem.* **43**, 1011 [1930]; R. BÖHM u. B. FLASCHENTRÄGER, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **157**, 115 [1930].
⁹ R. BÖHM, B. FLASCHENTRÄGER u. L. LENDLE, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **177**, 212 [1935].
¹⁰ B. FLASCHENTRÄGER, ZANGGER-Festschrift, Zürich 1934, **Bd. II**, S. 857.
¹¹ B. FLASCHENTRÄGER u. G. WIGNER, *Helv. chim. Acta* **25**, 569 [1942].

* Im folgenden als Phorbol bezeichnet.
¹² E. HECKER, *Z. Krebsforsch.* **65**, 325 [1963].
¹³ 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].
¹⁴ TH. KAUFFMANN u. H. NEUMANN, *Chem. Ber.* **92**, 1715 [1959].
¹⁵ E. HECKER, H. JARCZYK, J. G. MEYER, H. BRESCH u. I. BRACHMANN, *Z. Krebsforsch.* **66**, 478 [1965].
¹⁶ E. BAUMHEIER, Dissertation, Univ. Leipzig 1932.

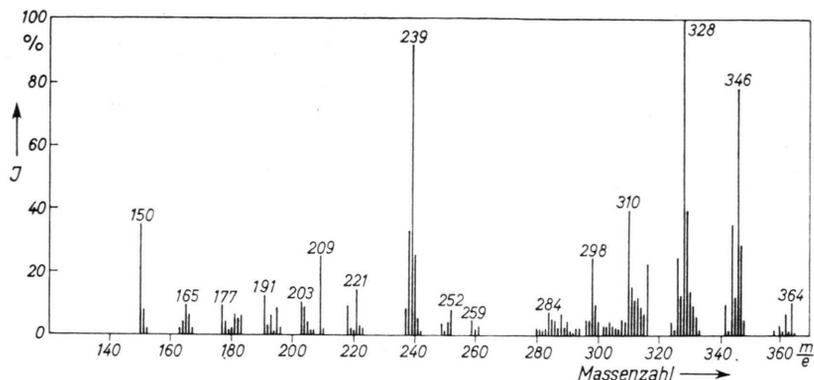


Abb. 1. Elektronenanlagerungs-Massenspektrum von Phorbol; Verdampfertemperatur 130°.

külen Wasser aus dem Molekularion ableiten. Wasserabspaltungen finden sich auch in den Elektronenstoß-Massenspektren; es gelang jedoch mit dieser Methode auch unter schonenden Meßbedingungen nicht, ein Molekülion zu beobachten; das Ion größerer Masse fand sich bei $m/e = 346$ *. Auch in den Elektronenstoßspektren sind die Massenzahlen $m/e = 328$ ($M - 2\text{H}_2\text{O}$) und $m/e = 310$ ($M - 3\text{H}_2\text{O}$) besonders intensiv vertreten; ferner scheint die Abspaltung von 28 Masseneinheiten ($328 \rightarrow 300$ oder $310 \rightarrow 282$) der nächste Fragmentierungsschritt zu sein.

Die Ergebnisse der Analysen von FLASCHENTRÄGER ($\text{C}_{20}\text{H}_{28-30}\text{O}_6$) kommen der von uns erstmals^{2, 6} mit physikalischen Methoden bestimmten Bruttoformel des Phorbols ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_6$) am nächsten. THOMAS und MARXER¹⁹ hatten demgegenüber $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_6$, KAUFFMANN und NEUMANN¹⁴ $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_6$ angenommen. ARROYO und HOLCOMB^{20, 21} beschreiben die Darstellung von Phorbol durch Alkoholyse eines Cocarcinogens C-3 und gelangen auch zur richtigen Bruttozusammensetzung $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_6$. VAN DUUREN und ORRIS²², die Phorbol durch Alkoholyse von Crotonharz erhielten, haben die Formel $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_6$ kürzlich bestätigt.

Phorbol zeigt in Äthanol und Dioxan die in Abb. 2 wiedergegebenen UV-Spektren. Die Absorption bei 196 $m\mu$ (in Äthanol) ist einer isolierten $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung zuzuordnen²³. Das Maximum bei 235 $m\mu$ entspricht dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang eines α, β -ungesättigten Ketons, die Bande bei 335 $m\mu$ ist nach Lage und Intensität als $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang die-

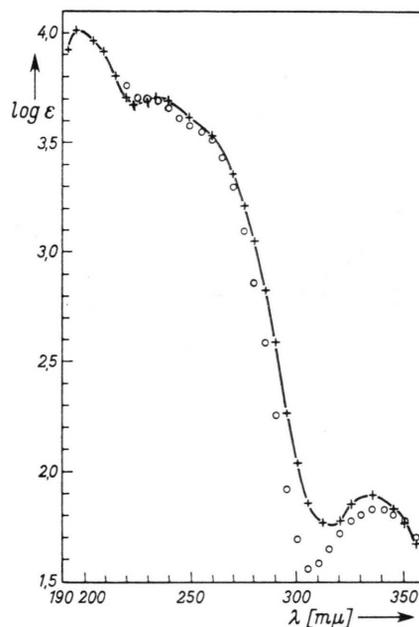


Abb. 2. UV-Spektren des Phorbols in Äthanol (+ - +) und Dioxan (o - o).

ser α, β -ungesättigten Carbonylgruppe anzusprechen. Geht man zu Dioxan als weniger polarem Lösungsmittel über, so tritt eine weitere Absorption bei 249 $m\mu$ etwas deutlicher hervor.

Die circulardichroitische Absorption der $n \rightarrow \pi^*$ - und $\pi \rightarrow \pi^*$ -Banden des Phorbols zeigen entgegengesetztes Vorzeichen (Abb. 3). Interessant ist eine

* Dieser Befund ist zuerst Massenspektren von Phorbol entnommen worden, die wir Herrn Prof. Dr. G. SPITTELER danken und wurde von uns reproduziert.

¹⁷ W. WALISCH, Chem. Ber. **94**, 2314 [1961].

¹⁸ M. v. ARDENNE, K. STEINFELDER, R. TÜMLER u. K. SCHREIBER, Experientia [Basel] **19**, 178 [1963].

¹⁹ A. F. THOMAS u. A. MARXER, Experientia [Basel] **14**, 320 [1958].

²⁰ E. ARROYO u. J. HOLCOMB, Chem. and Ind. **1965**, 350.

²¹ E. ARROYO u. J. HOLCOMB, J. med. Chem. **8**, 672 [1965].

²² B. L. VAN DUUREN u. L. ORRIS, Cancer Res. **25**, 1871 [1965].

²³ J. H. CHAPMAN u. A. C. PARKER, J. chem. Soc. [London] **1961**, 2075.

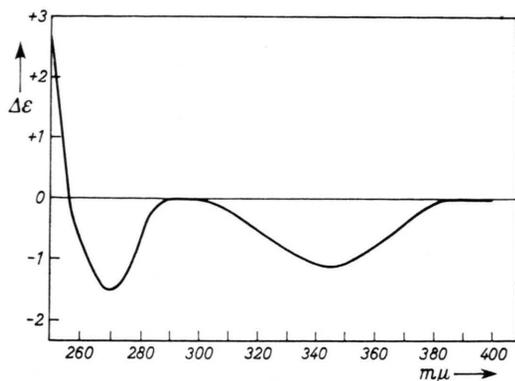


Abb. 3. Circulardichroische Absorption des Phorbols im Bereich von 250–400 $m\mu$ in Dioxan.

weitere dichroitische Absorption bei 270 $m\mu$. Das UV-Spektrum zeigt an dieser Stelle keine Bande.

Im IR-Spektrum sind für C=O- und C=C-Valenzschwingungen α,β -ungesättigter Carbonylsysteme charakteristische Banden zu erkennen.

KMR-Spektren des Phorbols können in d_5 -Pyridin/ D_2O (Abb. 4) und in d_6 -Dimethylsulfoxyd (d_6 -DMSO) gemessen werden (Tab. 1)²⁴. In diesen Spektren sind 7 CH-Gruppen (1 A-G), 2 CH_2 -Gruppen (2 A, B), 4 CH_3 -Gruppen (3 A-D) und 5 OH-Gruppen zu erkennen.

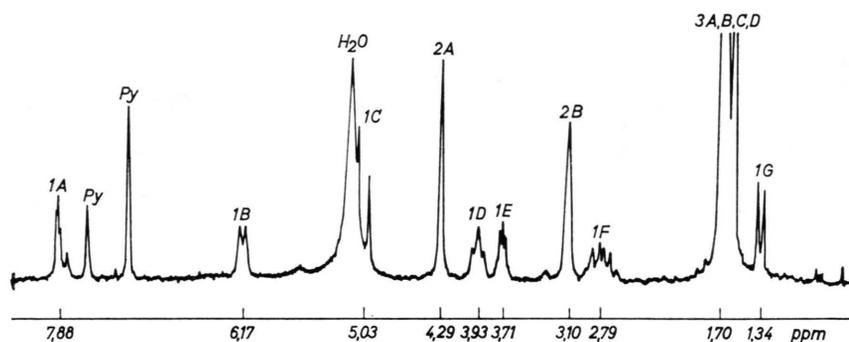


Abb. 4. KMR-Spektrum von Phorbol in d_5 -Pyridin/ D_2O (100 MHz, TMS 0,00 ppm).

Die Signale 1 C bzw. 2 A (Tab. 1) lassen sich Protonen zuordnen, die geminal zu einer sekundären bzw. primären Hydroxylgruppe stehen; nach Veresterung des Phorbols erscheinen sie bei niedrigerem Feld. Die restlichen drei Hydroxylgruppen des Phorbols müssen tertiär sein, da bei Veresterung keine zusätzlichen Verschiebungen zu beobachten sind. 1 A und 1 B können als Signale von Protonen an Doppelbindungen identifiziert werden; die Lage von 1 A spricht für ein β -Proton an einem α,β -ungesättigten Carbonylsystem. Reduktion der Carbonylgruppe zum sekundären Alkohol, der Hexahydroxy-Verbindung Phorbolol⁵⁻⁷ verschiebt

Signal	Intensität	δ in ppm (d_5 -Py/ D_2O)	δ in ppm (d_6 -DMSO)	Multiplizität*	J (Hz)
1 A	1	7,88	7,52	M	$\{J_1 = 1,$ $J_2 = 1$
1 B	1	6,17	5,44	D	$J = 6$
1 C	1	5,03	3,83	D	$J = 11$
1 D	1	3,93	2,91	T	$\{J_1 = 6,$ $J_2 = 6$
1 E	1	3,71	2,91	T	$\{J_1 = 1,$ $J_2 = 2$
1 F	1	2,79	—**	M	$\{J_1 = 11,$ $J_2 = 7$
1 G	1	1,34	0,52	D	$J = 6$
2 A	2	4,29	3,77	S	—
2 B	2	3,10	2,32	S	—
3 A	3	1,70	1,67	M	$\{J_1 = 1,$ $J_2 = 2$
3 B	3	ca. 1,6	1,15	S	—
3 C	3	ca. 1,7	1,04	S	—
3 D	3	ca. 1,7	0,88	D	$J = 7$
OH	1	—	5,44	—	—
OH	4	—	4,1–4,2	—	—

Tab. 1. KMR-Daten von Phorbol in d_5 -Pyridin/ D_2O und d_6 -Dimethylsulfoxyd. * S = Singulett, D = Dublett, T = Triplett, M = Multipl. **Nicht zuzuordnen.

1 A um 1,8 ppm nach höherem Feld. Signal 1 B kann dem β -Proton einer Allylalkoholgruppierung zugeordnet werden: Oxydation der Allylalkoholgruppierung zum α,β -ungesättigten Aldehyd^{2, 5, 7} verschiebt 1 B um

1 ppm nach niedrigerem Feld. Gleichzeitig erscheint ein Singulett bei 9,4 ppm (Aldehydproton), die α -Stellung dazu ist also substituiert.

Signal 1 G kann einem Proton an einem Cyclopropanring zugeordnet werden, da es in d_6 -DMSO bei 0,52 ppm liegt (vgl. Tab. 1 und weiter unten).

3 A entspricht einer Methylgruppe an einer Doppelbindung. Nach der Lage des Signals im Phorbol-triacetat (Tab. 3) ist α -Stellung an einem α,β -ungesättigten Carbonylsystem anzunehmen. Reduktion der Carbonylgruppe verschiebt 3 A um etwa 0,1 ppm nach höherem Feld. 3 B und 3 C lassen sich im Phorbol-triacetat als

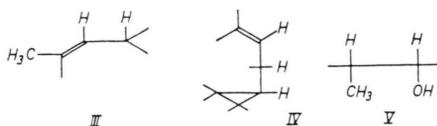
²⁴ E. HECKER, H. KUBINYI, CH. V. SZCZEPANSKI, E. HÄRLE U. H. BRESCH, Tetrahedron Letters [London] 1965, 1837.

Signale von Methylgruppen an vollständig substituierten Kohlenstoffatomen identifizieren. 3 D ist einer weiteren Methylgruppe zuzuordnen; das Signal liegt als Dublett vor (Tab. 1). Am α -ständigen C-Atom muß also noch ein Proton stehen.

eingestrahlt bei [ppm]	beobachtet bei [ppm]	Änderung der Multiplizität *	entkoppelte Aufspaltung in Hz
3A 1,70	1A 7,88	M \rightarrow S	$\{J_1 = 1$
1E 3,71			$\{J_2 = 1$
1D 3,93	1B 6,17	D \rightarrow S	$J = 6$
1B 6,17	1D 3,93	T \rightarrow D ($J = 6$)	$J = 6$
1G 1,34	1D 3,93	T \rightarrow D ($J = 6$)	$J = 6$
1A 7,88	1E 3,71	T \rightarrow S	$\{J_1 = 1,$
3A 1,70			$\{J_2 = 2$
3D ca. 1,6	1F 2,79	M \rightarrow D ($J = 11$)	$J = 7$
1D 3,93	1G 1,34	D \rightarrow S	$J = 6$

Tab. 2. Doppel- und Tripelresonanzmessung von Phorbol in d_5 -Pyridin/ D_2O . * S = Singulett, D = Dublett, T = Triplett, M = Multiplett.

Durch Doppel- und Tripelresonanzmessungen (Tab. 2) können zusätzliche Aussagen über die Strukturelemente des Phorbols gemacht werden. Die Methylgruppe 3 A zeigt eine long range-Kopplung mit dem Doppelbindungsproton 1 A; 1 A koppelt mit dem Proton 1 E einer benachbarten $-CH$ -Gruppe, ebenso zeigen die Wasserstoffe der Methylgruppe 3 A eine homoallylische long range-Kopplung mit 1 E, wie sie für das Strukturelement III bereits ausführlich in der Literatur beschrieben wurde²⁵. Das Doppelbindungsproton 1 B koppelt mit dem Proton 1 D, dem Wasserstoff einer $-CH$ -Gruppe. 1 D koppelt selbst wieder mit dem Proton am Cyclopropanring 1 G, so daß sich Teilstruktur IV ergibt. Proton 1 F, ebenfalls der Wasserstoff einer $-CH$ -Gruppe, koppelt mit den Wasserstoffen der Methylgruppe 3 D. Nach Entkopplung tritt für 1 F ein Dublett mit der Kopplungskonstante $J = 11$ Hz auf. Eine identische Kopplungskonstante für Signal 1 C, dem Wasserstoff geminal zur sekundären Hydroxylgruppe, zeigt, daß 1 C neben 1 F stehen muß, Teilformel V.



²⁵ N. S. BHACCA and D. H. WILLIAMS, Applications of NMR spectroscopy in Organic Chemistry, Holden Day Inc., London 1964, S. 110 ff.

Tri- und Penta-ester des Phorbols

Phorbol läßt sich mit einem Überschuß von Acetanhydrid in Pyridin zu einem Triacetat^{2, 6} umsetzen. Die Substanz schließt leicht Lösungsmittel ein: aus CCl_4 umkristallisierte Proben enthalten nach Trocknen im Hochvakuum bei 80° noch etwa 1 Mol CCl_4 (Halogenbestimmung). Petroläther wird weniger hartnäckig eingeschlossen, auch Benzol läßt sich am Hochvakuum weitgehend entfernen. Aus Benzol/Petroläther umkristallisiertes und im Hochvakuum bei 80° zur Gewichtskonstanz getrocknetes Phorbol-triacetat enthielt nach KMR-Messungen noch 1,3% Benzol. Korrigiert man die Analysenwerte der Substanz entsprechend ihrem Lösungsmittelgehalt, so erhält man die für Phorbol-triacetat $C_{26}H_{34}O_9$ zu erwartenden Werte. Schmelzpunktbestimmungen an Triacetat führen zu ähnlich unbefriedigenden Ergebnissen wie bei Phorbol: die Präparate schmelzen zwischen 110 und 130° , jedoch scharf innerhalb von 2° .

Elektronenlagerungs-Massenspektrometrie des Phorbol-triacetates liefert das zu erwartende Mol.-Gew. 490, während im Elektronenstoß-Massenspektrum als höchste Masse $m/e = 430$ gefunden wurde. Die wichtigsten Massenspitzen lassen sich durch die Abspaltung von insgesamt 3 Moll. Essigsäure und 1 Mol. Wasser deuten.

Das UV-Spektrum des Phorbol-triacetates in Äthanol zeigt Banden bei $194 - 200 m\mu$ (ϵ 12000), $232 m\mu$ (ϵ 5200) und $334 m\mu$ (ϵ 70). In Dioxan erhält man – ähnlich wie bei Phorbol – zusätzlich eine Bande bei $248 m\mu$ (ϵ 5000).

Um auszuschließen, daß es sich dabei um die Absorption einer Verunreinigung handelt, wurden 5 Proben Triacetat unterschiedlichen Reinigungsoperationen unterworfen (Craig-Verteilung, Umkristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln) und danach die Spektren gemessen. Mögliche Verunreinigungen sollten in den einzelnen Präparaten in verschiedenen Konzentrationen vorliegen und das Verhältnis der Extinktionen E_{230}/E_{248} beeinflussen. Tatsächlich wird aber ein konstanter Wert von 1,1 gefunden.

Im KMR-Spektrum des Phorbol-triacetats (Tab. 3) sind 3 Acetylgruppen (um 2,1 ppm) erkennbar. 2 Hydroxylgruppen (2,92 und 5,50 ppm) lassen sich mit D_2O austauschen. Phorbol enthält somit 3 mit Pyridin/Acetanhydrid veresterbare und 2 unter diesen Bedingungen nicht veresterbare Hydroxylgruppen. Diese Hydroxylgruppen des Triacetats lassen sich jedoch mit Acetanhydrid/*p*-Toluolsulfon-

Signal	Inten- sität	δ in ppm	Multipli- zität*	J [Hz]
1 A	1	7,59	M	? **
1 B	1	5,72	D	5-6
1 C	1	5,40	D	11
1 D	1	3,2-3,3	?	?
1 E	1	3,2-3,3	?	?
1 F ***	—	—	—	—
2 A	2	4,48	S	—
2 B	2	2,50	S	—
3 A	3	1,78	Q	$\left\{ \begin{array}{l} J_1 = 1-2, \\ J_2 = 1-2 \end{array} \right.$
3 B	6	1,27	S	—
3 D	3	0,91	D	7
Acetyl- gruppen	9	2,05-2,10	3S	—
OH	1	5,50	—	—
OH	1	2,78	—	—

Tab. 3. KMR-Daten von Phorbol-triacetat in CDCl_3 . * Q = Quadruplett. ** Nicht auflösbare Signale sind in den Spalten „Multiplizität“ und „ J [Hz]“ mit Fragezeichen versehen. *** Nicht zuzuordnen.

säure verestern und man erhält ein *Phorbol-pentaacetat*. — Mit Benzoylchlorid in Pyridin läßt sich Phorbol zu einem *Tribenzoat* vom Schmp. 213 – 215° umsetzen.

Phorbol-triacetat gibt unter energischen Bedingungen ein 2.4-Dinitrophenylhydrazon in mäßiger Ausbeute. Damit sind alle 6 Sauerstoffatome des Phorbols auf chemischem Wege bestätigt.

FLASCHENTRÄGER^{9, 10} beschreibt das oben erwähnte toxische Acetylphorbol vom Schmp. 119° als Tetraacetat, KAUFFMANN und NEUMANN¹⁴ beziehen auf $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_6$ und nehmen ein Triacetat an. ARROYO und HOLCOMB^{20, 21} sowie VAN DUUREN und ORRIS²² haben kürzlich ebenfalls über ein Phorbol-triacetat berichtet, ARROYO und HOLCOMB²¹ beschreiben außerdem ein Phorbol-tetraacetat. BAUMHEIER¹⁶ berichtet über ein Diacetat des Phorbols. THOMAS und MARXER¹⁹ diskutieren 2 Monoacetate und ein Diacetat: Diese Autoren gehen von $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_6$ aus, bezogen auf die richtige Bruttoformel $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_6$ für Phorbol würden ihre Analysen auch auf Phorboltriacetat und 2 Diacetate stimmen. — Ein Dibenzoat wurde von FLASCHENTRÄGER¹⁰ beschrieben. KAUFFMANN und NEUMANN¹⁴ deuteten diese Verbindung auf Grund ihrer Analysendaten als Tribenzoat.

Reduktion von Phorbol-triacetat mit LiAlH_4 ergibt unter Abspaltung der Esterfunktionen und Aufnahme von 2 H-Atomen Phorbol-ol, das bereits von KAUFFMANN und NEUMANN¹⁴ auf analogem Wege aus Phorbol-tribenzoat erhalten wurde. Phorbolol wird als Tetraacetat charakterisiert und zeigt um 230 $\text{m}\mu$ keine UV-Absorption mehr. Es ist mit den durch

reduktive Spaltung der isolierten Wirkstoffe erhaltenen Phorbolol-Präparaten^{2, 5-7} identisch.

Die katalytische Hydrierung von Phorbol-triacetat mit Palladium-Tierkohle bei Atmosphärendruck und Raumtemperatur liefert ein Hauptprodukt, das mit KMnO_4 oder Brom nicht mehr reagiert. Das *UV-Spektrum* (in Methanol) zeigt Banden bei 194 $\text{m}\mu$ (ϵ 2200) und 308 $\text{m}\mu$ (ϵ 40). Die Substanz kann danach keine C=C-Doppelbindungen mehr enthalten, die Absorption der Carbonylbande ist gegenüber Phorboltriacetat um 24 $\text{m}\mu$ hypsochrom verschoben. Im *KMR-Spektrum* treten die den Protonen 1 A und 1 B des Ausgangsmaterials entsprechenden Signale im Bereich der olefinischen Protonen nicht mehr auf. Das Signal der CH_2 -Gruppe des primären Alkohols (2 A in Phorbol) ist im Bereich oberhalb 2,5 ppm nicht mehr aufzufinden; die Substanz kann also in dieser Position keine Estergruppierung mehr enthalten. In Übereinstimmung damit liegen im Hydrierungsprodukt nur noch 2 Acetylgruppen (2,07 und 2,09 ppm) vor. Um 0,8 – 1,3 ppm treten ca. 15 Protonen auf; das Signal 1 G erscheint bei 0,7 ppm (Dublett, $J = 6$ Hz, Cyclopropanproton). Die *Elektronenstoß-Massenspektrometrie* liefert $m/e = 376$ als schwerstes Ion. Da die Substanz nach KMR ein Diacetat ist und die Acetylgruppe am C-Atom des ehemaligen Allylalkohols nicht mehr enthält, ist das Hydrierungsprodukt als *Desoxytetrahydrophorbol-diacetat* zu deuten. Es entsteht aus Phorbol-triacetat unter hydrogenolytischer Abspaltung von Essigsäure aus der Allylestergruppierung und Absättigung zweier C=C-Doppelbindungen. Wie im Fall des Triacetates konnte mit der Elektronenstoß-Massenspektrometrie nur M-60 als Ion höchster Masse gefunden werden.

Schon PAAL und ROTH²⁶ haben gefunden, daß Crotonharz durch Hydrierung mit kolloidalem Platin und Wasserstoff den scharfen Geschmack und die giftige Wirkung vollständig verliert. FLASCHENTRÄGER¹⁰ vermutete im Phorbol 3 C=C-Doppelbindungen (Jodzahl). Bei der Hydrierung mit Platin erhielt er kein einheitliches Produkt. Nach KAUFFMANN und NEUMANN¹⁴ nimmt ein Mol Phorbol mit Platin als Katalysator unter reduktiver Abspaltung einer Hydroxylgruppe langsam 3 Mole Wasserstoff auf, ohne daß die Carbonylgruppe angegriffen wird. VAN DUUREN, ARROYO und ORRIS²⁷ beobachteten die Bildung einer phenolischen Substanz vom Schmp. 96° bei der katalytischen Hydrierung eines nicht näher charakterisierten Gemisches

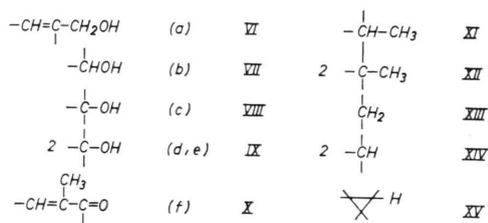
²⁶ C. PAAL u. K. ROTH, Ber. dt. chem. Ges. **42**, 1541 [1909].

²⁷ B. L. VAN DUUREN, E. ARROYO u. L. ORRIS, J. med. Chem. **6**, 616 [1963].

cocarcinogener Substanzen aus Crotonöl. Später erhielten ARROYO und HOLCOMB²⁰ bei der katalytischen Hydrierung des Cocarcinogens C-3 ein Gemisch von Hydrierungsprodukten, aus dem sie eine kristalline Substanz (Schmp. 101–102°) mit einem Mol.-Gew. von M=604 (massenspektrometrisch) isolierten. Nach den UV-Daten der Autoren ist darin die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe offenbar noch enthalten.

Strukturelemente und Partialstrukturen des Phorbols

Mit den an Phorbol und den beschriebenen Derivaten gewonnenen Befunden sind alle 6 Sauerstofffunktionen* und die beiden C=C-Doppelbindungen festgelegt.



Die primäre Hydroxylgruppe (a, vgl. Formelschema), die in den Wirkstoffen des Crotonöls frei vorliegt, ist die OH-Gruppe eines primären Allylalkohols, der mit aktiviertem MnO_2 zum Aldehyd oxydiert werden kann. Diese Hydroxylgruppe ist in den natürlichen Wirkstoffen und im Phorbol acylierbar und kann – frei^{10, 14} oder verestert – in bekannter Reaktion hydrogenolytisch abgespalten werden: aus Phorbol-(a,b,c)-triacetat entsteht (a)-Desoxy-tetrahydro-phorbol-(b,c)-diacetat. Wie aus KMR-Daten hervorgeht, ist das zur allylischen CH_2 -Gruppe α -ständige C-Atom vollständig substituiert; β -ständig ist jedoch ein Wasserstoff vorhanden (Strukturelement VI).

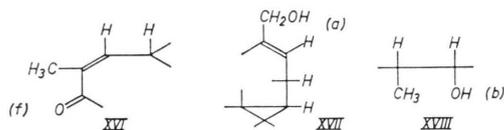
Unter Pyridinkatalyse lassen sich zwei weitere Hydroxylgruppen b (VII) und c (VIII) verestern, die auch in den Wirkstoffen verestert vorliegen. Nach Aussage der KMR-Spektren ist (b) sekundär und (c) tertiär. Die beiden restlichen Hydroxylgruppen d und e (IX) können nur unter Säurekatalyse acetyliert werden und sind tertiär. Die Acylierbarkeit der tertiären Hydroxylgruppe (c) mit Acetanhydrid/Pyridin ist bemerkenswert, da sie darin

vom Verhalten gewöhnlicher tertiärer Hydroxylgruppen abweicht.

Die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe (f) ist im Phorbol mit den üblichen Carbonylreagenzien nicht nachweisbar^{2, 5–7, 10, 28}. Von Phorbol-triacetat läßt sich jedoch ein 2,4-Dinitrophenylhydrazon erhalten. Strukturelement X enthält ferner die nach KMR-Daten α -ständige Methylgruppe. Werden die Wirkstoffe, Phorbol-triacetat oder Phorbol-tribenzoat reaktiv gespalten, so entsteht aus der Carbonylfunktion eine sekundäre Hydroxylgruppe, die sich mit Pyridin/Acetanhydrid verestern läßt: man erhält Phorbol-(f)-ol-(a,b,c,f)-tetraacetat.

FLASCHENTRÄGER¹⁰, THOMAS und MARXER¹⁹ sowie KAUFFMANN et al.^{14, 29} konnten nicht alle Sauerstofffunktionen des Phorbols zuordnen.

Neben den Sauerstofffunktionen ergeben sich aus den KMR-Spektren weiterhin die Strukturelemente XI–XV. Sie enthalten zusammen mit den Strukturelementen VI–X alle H- und O-Atome des Phorbols. Ein Teil davon, nämlich X und XIV, VI, XIV und XV, sowie VII und XI lassen sich auf Grund der Ergebnisse der Doppelresonanzmessungen (Formeln III–V) zu den Partialstrukturen XVI–XVIII erweitern. Aus diesen Partialstrukturen und den restlichen Strukturelementen VIII, IX, XII und XIII muß sich die Strukturformel des Phorbols ergeben.



Keine der beiden von ARROYO und HOLCOMB^{20, 21} vorgeschlagenen Strukturen für den Grundalkohol eines von ihnen isolierten wirksamen Prinzips aus Crotonöl ist mit den Daten der hier beschriebenen Teilstrukturen vereinbar³⁰. – Durch Verknüpfung der abgeleiteten Strukturelemente und Partialstrukturen auf Grund weiterer chemischer und spektroskopischer Befunde sowie den früher von anderen Autoren^{14, 29} veröffentlichten Ergebnissen von Bleitetraacetat-Spaltungen haben wir eine vorläufige Strukturformel für Phorbol vorgeschlagen²⁴. Inzwischen wurde die oxydative Spaltung an geeigneten Phorbol-Derivaten von uns überprüft^{3, 4}. Das Ergebnis dieser Überprüfung sowie neue chemische Befunde und circulardichroitische Messungen zeigen, daß diese Verknüpfung der Strukturelemente und Partialstrukturen des Phorbols zu revidieren ist^{3, 4}.

* Um die Hydroxylgruppen und die Carbonylgruppen unabhängig von der Struktur des Kohlenstoffskelettes diskutieren zu können, werden im folgenden kleine Buchstaben (a–f) verwendet. Die Strukturelemente des Phorbols erhalten römische Ziffern.

²⁸ F. FRH. v. FALKENHAUSEN, Z. analyt. Chem. **99**, 241 [1934].

²⁹ TH. KAUFFMANN, A. EISINGER, W. JASCHING u. K. LENHARDT, Chem. Ber. **92**, 1727 [1959].

³⁰ E. HECKER, H. KUBINYI, H. BRESCH u. CH. v. SZCZEPANSKI, J. med. Chem. **9**, 246 [1966].

Entsprechend der Zahl und Natur der Sauerstoff-funktionen und der Zahl der C=C-Doppelbindungen liegt dem Kohlenstoffskelett des Phorbols der gesättigte Kohlenwasserstoff C₂₀H₃₄ zugrunde, der Tiglian* genannte wurde^{2, 6}. Dem Defizit von 8 H-Atomen entsprechend muß Tiglian 4 Kohlenstoffringe enthalten. Phorbol, ein Pentahydroxytigliadienon ist vermutlich ein Diterpen.

Beschreibung der Versuche

Elementaranalysen sind in den Laboratorien der Union Carbide European Research Associates, Brüssel und bei F. und E. PASCHER, Bonn, ausgeführt worden. Die Substanzen werden vor der Analyse im Hochvakuum bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Schmelzpunkte werden an getrockneten Substanzen auf dem Mikroskop-Heiztisch 350 der Fa. Leitz bestimmt und sind unkorrigiert.

UV-Spektren Lösungsmittel-freier Substanzen werden mit den Beckman-Spektralphotometern DK 2 und DK 2 a „far UV“ aufgenommen. Bei Absorptionen unterhalb von 220 mμ werden 0,1-cm-Küvetten verwendet und das Gerät mit Stickstoff gespült. — IR-Spektren sind mit den Perkin-Elmer-Spektralphotometern 21 und 521 gemessen. — Circular dichroitische Messungen sind am Circular dichrograph der Universität Bonn ausgeführt. — Zur Bestimmung der optischen Drehung getrockneter Substanzen dient ein lichtelektrisches Polarimeter der Fa. Carl Zeiss Type I. Es wird in 0,2- und 0,5-dm-Rohren bei 546,1 und 577,8 mμ gemessen und auf die D-Linie umgerechnet. — KMR-Spektren werden mit den Geräten A 60 und HR 100 der Fa. Varian Associates aufgenommen. Als innerer Standard dient Tetramethylsilan (TMS, δ=0,00 ppm). Bei der tabellarischen Wiedergabe der Spektren werden die Signale so bezeichnet, wie in Abb. 4 für Phorbol angegeben ist; zur Festlegung von Kopplungskonstanten werden Doppelresonanzmessungen mit herangezogen. — Elektronenstoß-Massenspektren sind mit dem Gerät CH-4 der Fa. MAT Bremen, Elektronenanlagerungs-Massenspektren am Forschungsinstitut Manfred v. Ardenne, Dresden-Weißer Hirsch, gemessen. Zur Säulenchromatographie wird, wenn nicht anders angegeben, Kieselgel der Fa. E. Merck (Korngröße 0,05–0,20 mm, mit 13 Gew.-% Wasser desaktiviert) verwendet.

Untersuchung auf reduzierende Wirkung

Tollens Reagenz: Zu 1 ml einer n/10 wäßrigen Silbernitratlösung gibt man so viel 2,5-proz. wäßrigen Ammoniak, bis sich der zuerst gebildete Niederschlag gerade wieder gelöst hat (ca. 4 Tropfen). Diese Lösung wird zu wenigen mg Phorbol in 0,5 ml Methanol gegeben. Beim Erwärmen tritt nach 1–2 Min. ein braunschwarzer Niederschlag auf.

* Wegen des Vorkommens von Phorbol in *Croton tiglium* L.

Tillmanns Reagenz: 0,05% 2,6-Dichlorphenol-indophenol-Natrium in 50-proz. Äthanol. Phorbol wirkt in n/100 NaOH reduzierend.

Dünnschichtchromatographie

Wenn nicht anders vermerkt, gelten R_F-Werte für Dünnschichtplatten, die bei Kammersättigung entwickelt werden. Hierzu wird ein Filtrierpapier geeigneter Größe in die Kammer gestellt. Zur Herstellung der Dünnschichtplatten werden 29 g Kieselgel G nach Stahl der Fa. E. Merck und 1 g Leuchtstoff ZS Super 6 der Fa. Riedel de Haen mit 60 ml Wasser angerührt und mit dem Streichgerät der Fa. Desaga auf Glasplatten (20·20 cm) gestrichen. Nach kurzem Vortrocknen an der Luft werden die Platten 1 Stde. bei 110° getrocknet und später über CaCl₂ aufbewahrt. Die entwickelten Platten werden im Licht einer Quecksilberdampflampe betrachtet.

Phorbol (Pentahydroxytigliadienon)

500 g Crotonöl (DAB 6) werden mit 1,25 l Methanol in einer 5-l-Flasche 3 Stdn. unter Stickstoff geschüttelt. Danach werden 55 g Bariumhydroxyd (Ba(OH)₂·8 H₂O) — in 1 l Methanol unter schwachem Erwärmen gelöst und filtriert — zugesetzt. Es wird nochmals 15 Stdn. unter Stickstoff geschüttelt, dabei ist in der Flasche kein Druckanstieg zu beobachten. Von den entstandenen Bariumseifen filtriert man ab; das hellgelbe Filtrat wird am Rotationsverdampfer (Büchi) bei 50–60° Badtemperatur eingeeengt, bis kein Lösungsmittel mehr übergeht und sich Blasen bilden. Den Rückstand nimmt man in 2 l Wasser und 400 ml Äther auf. Nach kräftigem Schütteln haben sich auch die dunkelbraunen Schmierer gelöst. Die Trennung der Phasen macht gelegentlich Schwierigkeiten — wenn nötig, muß die Ätherphase zentrifugiert werden. Die Ätherphase wird verworfen. Bei Schütteln mit Äther und den vorhergehenden Arbeitsgängen ist wegen der entzündlichen Wirksamkeit des Crotonöls und der Extrakte auf sauberes Arbeiten besonders zu achten. Die wäßrige Phase wird mit 2-n. Schwefelsäure auf p_H 5 eingestellt (Verbrauch ca. 7 ml). Nach Zusatz von 30 ml gesättigter wäßriger Natriumsulfatlösung läßt man über Nacht kühl stehen. — Man filtriert dann vom ausgefallenen Bariumsulfat ab, bringt das Filtrat mit einigen Tropfen 2-n. Natronlauge auf p_H 7 und schüttelt erst mit 250 ml Essigester, dann 2-mal mit je 200 ml Äther aus. Die organischen Phasen werden verworfen und die wäßrige Phase am Rotationsverdampfer bei 45–50° eingeeengt, bis bei Ölpumpenvakuum nichts mehr übergeht. Der ölige, viel Glycerin enthaltende Rückstand wird mit 50 ml absolutem Äthanol in der Kälte digeriert. Die nach Absaugen verbleibenden Salze werden 4-mal mit je 50 ml warmem abs. Äthanol extrahiert. Der Salzurückstand darf beim Kochen mit konz. HCl nur eine schwache Rotfärbung ergeben („Phorbolreaktion“¹⁶). Die vereinigten äthanolischen Extrakte werden auf ca. 50 ml eingeeengt und kühl gestellt. Im Verlauf einiger Tage kristallisiert Alkoholphorbol aus. Die Kristallisationsgeschwindigkeit ist

stark von der Viskosität des Glycerin-haltigen Rückstandes abhängig — es empfiehlt sich, die Ansätze anzupumpen **. Die Kristalle werden auf einer G2-Fritte abgesaugt und mehrmals mit wenig eiskaltem abs. Äthanol gewaschen. Ausbeute an Rohprodukt 5,3 bis 6,0 g (1,1–1,2 Gew.-% des eingesetzten Crotonöls). Zur Reinigung werden 5 g Rohprodukt in 40 ml Äthanol/Wasser (10/1) unter Erwärmen gelöst. Aus der heiß filtrierte Lösung kristallisiert beim längeren Stehen Alkoholphorbol in farblosen Kristallen. Ausbeute: 1,6–2,0 g, Schmp. zwischen 238 und 243°. Weitere 2,0 bis 2,2 g Alkoholphorbol mit einem Schmp. zwischen 228 und 234° lassen sich durch Einengen der Mutterlauge auf die Hälfte und erneutes Stehenlassen gewinnen. Diese Fraktionen müssen nochmals umkristallisiert werden. Charakterisierung einer Fraktion vom Schmp. 238–239°:

UV (in Äthanol): λ_{\max} 234, 333 m μ (ϵ 4370, 66).
IR (in KBr): ν_{OH} 3370 (breit); $\nu_{\text{C=O}}$ 1720; $\nu_{\text{C=C}}$ 1630/cm.

Zur Überführung von Alkoholphorbol in „Wasserphorbol“ werden 10 g Alkoholphorbol in 47 ml Wasser kalt gelöst. Die Lösung wird im offenen Kolben in ein Wasserbad von 60–80° gestellt und gelegentlich umgeschüttelt. Nach 30–40 min sind 6–7 g (60–70 Gew.-%) Phorbol in farblosen Kristallen ausgefallen, deren Schmp. zwischen 227 und 241° liegt. Die Mutterlauge kann zum Überführen von weiterem Alkoholphorbol in Phorbol verwendet werden.

Aus wäßriger Lösung kristallisiertes Phorbol ist schwer löslich in CCl₄, CHCl₃, Acetonitril, Essigester, Nitromethan, Aceton, Äthanol, Wasser, Eisessig und Dioxan; es ist gut löslich in Dimethylsulfoxyd, Dimethylformamid, Pyridin und Gemischen von Äthanol, Aceton oder Dioxan mit Wasser.

Charakterisierung einer Fraktion vom Schmp. 238,5 bis 240,5°; $[\alpha] +116^\circ$ (0,4% in Dioxan):

C ₁₉ H ₂₆ O ₆ (350,4)					
Ber.	C 65,12	H 7,48	O 27,40,		
C ₁₉ H ₂₈ O ₆ (352,4)					
Ber.	C 64,75	H 8,01	O 27,24,		
C ₂₀ H ₃₀ O ₆ (366,5)					
Ber.	C 65,55	H 8,25	O 26,20,		
C ₂₀ H ₂₈ O ₆ (364,4)					
Ber.	C 65,91	H 7,74	O 26,34,		
Gef.	C 65,67	H 7,82	O 26,66,		
	C 65,76	H 7,89	O 26,58.		

Massenspektren: Elektronenanlagerungs-Massenspektrum vgl. Abb. 1. Elektronenstoß-Massenspektrum (CH₄, 70 eV, Massenspitzen $m/e \geq 282$ mit mehr als 25% rel. Intensität):

m/e	282	300	310	328	346	364
$I[\%]$	26	31	43	100	34	0

** Unser erster, von H. J. JARCYK bereiteter Phorbolansatz stand mehr als 2 Jahre (Okt. 1959 bis Jan. 1962) bei 4° im Kühlschränk, ohne zu kristallisieren. Zugabe einiger unreiner Kristalle von Alkoholphorbol, die Herr Prof. Dr.

UV (in Äthanol, 0,1 cm Küvette und Dioxan, 1 cm Küvette): vgl. Abb. 2.

CD (in Dioxan): vgl. Abb. 3.

IR (in KBr): ν_{OH} 3500 (scharf) und 3250 (breit); $\nu_{\text{C=O}}$ 1700; $\nu_{\text{C=C}}$ 1640/cm.

KMR (in d₆-DMSO und d₅-Pyridin/D₂O): vgl. Tabn. 1, 2 und Abb. 4.

Phorbol-ester

Phorbol-(a,b,c)-triacetat (Pentahydroxy-tigliadienon-(a,b,c)-triacetat): Zu 500 mg (1,4 mMol) Phorbol — in 15 ml abs. Pyridin gelöst — werden 1,5 ml (14 mMol) Acetanhydrid getropft. Nach 19 Stdn. Stehen bei Raumtemperatur wird der Ansatz zu 100 ml Wasser in einen 250 ml-Scheidetrichter gegeben. Nach gutem Durchmischen schüttelt man 4-mal mit je 50 ml Äther aus. Die Wasserphase wird verworfen, sie enthält keine Phorbol-ester mehr. Die Ätherphasen werden vereinigt und zur Entfernung des Pyridins 3-mal mit 100 ml 1-n. Schwefelsäure ausgeschüttelt. Schließlich wird 1-mal mit 100 ml Wasser, 1-mal mit 100 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung und 3-mal mit 100 ml Wasser gewaschen. Die Ätherphase wird über MgSO₄ getrocknet und abrotiert. Ausbeute 607–663 mg (90 bis 98%) dünn-schichtchromatographisch einheitliches Produkt. Zur weiteren Reinigung werden 500 mg Rohprodukt aus 11 ml Benzol/Petroläther (Sdp. 60–70°) = 1/1 umkristallisiert. Man erhält 377 mg farbloser Kristalle vom Schmp. 120–122°. Nochmaliges Umkristallisieren aus 4 ml desselben Lösungsmittels liefert 258 mg Phorbol-triacetat vom Schmp. 110–111°, $[\alpha] +66^\circ$ (1% in Dioxan). — Die am Hochvakuum zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz enthält noch 1,3% Benzol, wie sich aus der Integration des Benzol-signalen bei 7,36 ppm im KMR-Spektrum ergibt (Lösungsmittel CDCl₃).

C ₂₆ H ₃₄ O ₉ (490,6)			
Ber.	C 63,66	H 6,97	O 29,25.
C ₂₆ H ₃₄ O ₉ + 1,3% C ₆ H ₆			
Ber.	C 64,03	H 6,98	O 28,97,
Gef.	C 63,86	H 6,84	O 29,04.

Elektronenanlagerungs-Massenspektrum (tv 120 °C): Massenspitzen mit mehr als 15% rel. Intensität

m/e	490	472	430	412	370	310	292
$I[\%]$	30	17	78	100	60	50	100

UV (in Äthanol): λ_{\max} 194–200, 232, 334 m μ (ϵ 12000, 5200, 70),

UV (in Dioxan): λ_{\max} (230), 248, 335 m μ (ϵ 5500, 5000, 70).

CD (in Dioxan): Min. 266, Min. 345 m μ ($\Delta\epsilon$ –1,03, –0,657).

IR (3,6% in CHCl₃): ν_{OH} 3380 (breit) und 3550 (scharf); $\nu_{\text{C=O}}$ 1700, 1725; $\nu_{\text{C=C}}$ 1623/cm.

TH. KAUFFMANN freundlicherweise zur Verfügung stellte, brachten den Ansatz innerhalb weniger Stdn. zur Kristallisation.

Bei Verdünnung 1:20 in 20-facher Schichtdicke keine Veränderungen im OH-Bereich; $\nu_{C=C}$ 1592 und 1620/cm.

KMR-Spektrum (in $CDCl_3$): vgl. Tab. 3.

Bestimmung des Lösungsmittelgehaltes von aus CCl_4 umkristallisiertem Phorbol-triacetat durch Elementaranalyse: 304 mg Phorbol-triacetat werden aus 4 ml CCl_4 umkristallisiert. Man erhält 229 mg farbloser Kristalle vom Schmp. 113–116°. Nochmaliges Umkristallisieren aus 3 ml CCl_4 liefert 179 mg vom Schmp. 114–116°.

$C_{26}O_{34}O_9$ (490,6)

Ber. C 63,66 H 6,97 O 29,35,
Gef. C 47,50 H 5,38 O 22,69 Cl 24,70.

Die Substanz enthält demnach 26,8 Gew.-% CCl_4 , entspr. 1,2 Mole CCl_4 pro Mol Triacetat.

2,4-Dinitrophenylhydrazon von Phorbol-triacetat: 429 mg (0,87 mMol) Phorbol-triacetat werden mit 636 mg (4,78 mMol) 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 25 ml Chloroform/Eisessig = 1/1 gelöst. Man erhitzt 70 Stdn. am Rückfluß auf 70°, setzt nach dieser Zeit weitere 427 mg (2,44 mMol) Dinitrophenylhydrazin zu und kocht — nachdem verdunstetes Lösungsmittel ersetzt wurde — weitere 70 Stdn. am Rückflußkühler. Nach dem Abkühlen setzt man 25 ml Wasser zu und schüttelt mit insgesamt 250 ml CH_2Cl_2 aus. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5% wäßriger $KHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Die Säulenchromatographie des Trockenrückstands (Systeme nacheinander Petroläther/Äther = 9/1, 4,5/1 und 2/1) liefert 136 mg (23% d. Th.) dünn-schichtchromatographisch einheitliche Substanz, R_f -Wert 0,46 in Methylchlorid/Aceton = 11:1. Nach Umkristallisieren aus Petroläther/Äther = 2/1 erhält man 91 mg orangefarbener Nadeln vom Schmp. 250 bis 251°, $[\alpha] -213^\circ$ (1% in Dioxan).

$C_{32}H_{38}O_{12}N_4$ (470,7)

Ber. C 57,31 H 5,71 N 8,35,
Gef. C 57,23 H 5,84 N 8,35.

UV (in Methanol): λ_{max} 257, (290), 384 $m\mu$ (ϵ 15200, (6600), 28300).

IR (in KBr): 3390, 1740, 1720, 1605, 1585, 1510, 1500/cm.

KMR-Spektrum (in $CDCl_3$): Gegenüber Triacetat sind folgende Signale verändert oder neu hinzugekommen: 11,8 ppm ($>NH$ austauschbar); 9,1 ppm ($J=2$ Hz, H-3'); 8,3 ppm ($J=10$ und 2 Hz, H-5'); 7,9 ppm ($J=10$ Hz, H-6'); 6,67 ppm (1 A); 2,6 und 2,8 ppm (2 B); 1,9 ppm (3 A). Die Protonen am aromatischen Kern sind bei normaler Zählung gestrichen bezeichnet.

Phorbol-(a,b,c,d,e)-pentaacetat (Pentahydroxy-tigliadienon-(a,b,c,d,e)-pentaacetat: 1,04 g (2,1 mMol) Phorbol-triacetat werden in 50 ml Acetanhydrid gelöst, mit 1,1 g *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch verfärbt sich über grün nach braun. Nach 48 Stdn. wird der Ansatz in eine Lösung von 1,5 g Natriumacetat in 300 ml Wasser gegossen. Das Gemisch wird geschüt-

telt bis alles Acetanhydrid hydrolysiert ist und dann 2 Stdn. sich selbst überlassen. Das ausgefallene Produkt nimmt man in 200 ml Methylchlorid auf und schüttelt die wäßrige Phase 3-mal mit je 100 ml Methylchlorid aus. Die vereinigten organischen Phasen werden 5-mal mit 100 ml 5-proz. $KHCO_3$ -Lösung, dann mit 200 ml Wasser gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt (1,08 g) wird an 200 g Kieselgel chromatographiert: das Pentaacetat läßt sich mit CH_2Cl_2 /Äther = 20/1 eluieren. Um geringe Mengen stark gefärbter Substanzen abzutrennen, wird das nach Chromatographie erhaltene Harz in wenig Äther gelöst; es kristallisieren 934 mg (80% d. Th.) farbloser Kristalle vom Schmp. 169–172°. Nach Umkristallisieren aus Petroläther/Äther liegt der Schmp. bei 170 bis 173°, $[\alpha] +108^\circ$ (1% in Dioxan).

$C_{30}H_{38}O_{11}$ (574,60)

Ber. C 62,71 H 6,62,
Gef. C 62,44 H 6,59.

UV (in Methanol): λ_{max} 245, 316 $m\mu$ (ϵ 4650, 76).

IR (in CH_2Cl_2): $\nu_{C=O}$ 1712, 1730; $\nu_{C=C}$ 1635/cm.

KMR (in $CDCl_3$): Gegenüber Triacetat ist verändert: 7,15 ppm (1 A); 2,68 und 2,45 ppm (2 B); 1,93 bis 2,11 ppm (5 Acetylgr.); 1,13 und 1,28 ppm (3 B, C).

Phorbol-(a,b,c)-tribenzoat (Pentahydroxy-tigliadienon-(a,b,c)-tribenzoat: 5 g Wasserphorbol (13,7 mMol) werden in 50 ml abs. Pyridin gelöst und mit 15 ml (87,5 mMol) Benzoylchlorid versetzt. Nach kurzem Umschütteln läßt man 18 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Danach wird der Ansatz in 400 ml Wasser gegossen und über Nacht gerührt, um entstandenes Benzoesäureanhydrid zu zerstören. Man setzt 300 ml Methylchlorid zu und arbeitet auf, wie für Phorbolpentaacetat beschrieben, wobei zunächst mit 1-n. HCl, dann mit 5-proz. $KHCO_3$ -Lösung und schließlich mit Wasser gewaschen wird. Der Trockenrückstand wird an 900 g Al_2O_3 (neutral, Akt. IV) chromatographiert (Elutionsmittel nacheinander CCl_4 , $CCl_4/CH_2Cl_2 = 9/1$, 8/2 und 7/3). Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand aus wenig Aceton umgelöst, um geringe Verunreinigungen abzutrennen. Man erhält 6,5 g (70% d. Th.) farblose Nadelchen vom Schmp. 152–156 und 213–215°. Nach 24 Stdn. Trocknen im Hochvakuum bei 110° wird nur der Schmp. 215–217° gefunden, $[\alpha] -15^\circ$ (1% in Dioxan).

$C_{41}H_{40}O_9$ (676,7)

Ber. C 72,76 H 5,96,
Gef. C 72,84 H 6,09.

UV (in Methanol): λ_{max} 230 $m\mu$ (ϵ 53000).

IR (in KBr): ν_{OH} 3400; $\nu_{C=O}$ 1695, 1715; $\nu_{C=C}$ 1580, 1595, 1620/cm.

KMR (in $CDCl_3$): Gegenüber Triacetat ist verändert: 7,3–8,1 ppm (ca. 16 Protonen); 5,87 ppm (1 C); 1,33 und 1,47 ppm (3 B, C). Die Signale 1 B, 1 D, 1 E, 2 A und 2 B sind um 0,1–0,2 ppm nach kleinem Feld verschoben.

Reduktions- und Hydrierungsprodukte

Phorbol-(f)-ol (Hexahydroxy-tigliadien): Die Reduktion von Phorbol-triacetat mit LiAlH_4 wird entsprechend der zur Reduktion der Wirkstoffe angegebenen Vorschrift^{2,7} ausgeführt. Aus 600 mg (1,2 mMol) Phorbol-triacetat werden mit 456 mg (12 mMol) LiAlH_4 332 mg amorphes Produkt erhalten. Die Kristallisation aus 5 ml Methanol liefert 288 mg Substanz vom Schmp. 210–214°. Nach erneutem Umkristallisieren aus demselben Lösungsmittel erhält man 254 mg vom Schmp. 218–220°, die nochmals umkristallisiert werden: 210 mg vom Schmp. 222–225° (47% d. Th.), $[\alpha] +54^\circ$ (2% in Methanol). R_f im System Aceton/Essigester = 3/2 (ungesättigte Kammer, Besprühen mit wäßriger KMnO_4 -Lösung): 0,4.

$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_8$ (366,5)

Ber. C 65,55 H 8,25 O 26,20,
Gef. C 65,10 H 8,56 O 26,57.

UV (in Äthanol): keine Absorption oberhalb 210 $m\mu$.

IR (in KBr): νOH 3330–3390 (breit); breite Bande zwischen 1625 und 1650/cm.

Phorbol-(f),ol-(a,b,c,f)-tetraacetat (Hexahydroxy-tigliadien-(a,b,c,f)-tetraacetat: 117 mg (0,32 mMol) Phorbolol werden in 4 ml abs. Pyridin gelöst und nach Kühlen im Eisbad mit 2 ml (13,3 mMol) Acetanhydrid versetzt. Danach läßt man 24 Stdn. im Kühlschranks stehen. Die Aufarbeitung erfolgt nach den früher gegebenen Vorschrift^{2,7}. Nach dem ersten Umkristallisieren werden 130 mg Substanz, Schm. 186–187° erhalten. Ein zweites Umkristallisieren liefert 121 mg Substanz, Schmp. 189°, ein drittes 111 mg vom Schmp. 189° (65% d. Th.), R_f 0,25 (Benzol/Essigester = 3/1, Kammer ungesättigt, Anfärben mit wäßriger KMnO_4 -Lösung).

$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{10}$ (534,6)

Ber. C 62,91 H 7,16 O 29,93,
Gef. C 63,03 H 7,00 O 29,96.

Elektronenstoß-Massenspektrum: Molekularspitze bei m/e 534.

UV (in Methanol): λ_{max} 194,5 $m\mu$ (ϵ 16000).

IR (in KBr): νOH 3400 (scharf); $\nu\text{C}=\text{O}$ 1730; breite, intensive Bande zwischen 1230 und 1240/cm.

KMR (in CDCl_3): Gegenüber Phorbol-triacetat ist verändert: ca. 5,8 ppm (1 A); ca. 5,5 ppm (bei Reduktion entstandenes Proton); um 2,1 ppm (4 Acetylgruppen).

(a)-Desoxy-tetrahydro-phorbol-(b,c)-diacetat (*a-Desoxy-tetrahydroxy-tiglianon-(b,c)-diacetat*): 800 mg (1,6 mMol) Phorbol-triacetat werden in 100 ml Essigester bei Normaldruck und Raumtemperatur mit 1,2 g Palladium/Tierkohle (10% Pd) als Katalysator hydriert. Nach 60 Stdn. ist die Reaktion beendet. Durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Essigester = 10/3, ungesättigte Kammer) kann ein in geringer Menge entstehendes Nebenprodukt vom R_f ca. 0,4 abgetrennt werden. Das gesuchte Hydrierungsprodukt zeigt einen R_f von ca. 0,7 – die entsprechende Zone kann auf der Platte durch Besprühen eines schmalen Spaltes mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz³¹ ermittelt werden: man erhält eine grüne Färbung. Ausbeute ca. 600 mg (85% d. Th.) eines farblosen Harzes, $[\alpha] +131^\circ$ (1% in Dioxan).

Elektronenstoß-Massenspektrometrie: höchste Massenspitze bei m/e 376.

UV (in Methanol): λ_{max} 194, 308 $m\mu$ (ϵ 2200, 40).

IR (in KBr): νOH 3415; $\nu\text{C}=\text{O}$ 1725, 1740/cm; keine C=C-Banden zwischen 1610 und 1660/cm.

KMR (in CDCl_3): 5,4 ppm ($J = 10$ Hz, 1 C); um 2,1 ppm ca. 10 Protonen, davon 2 Acetylgruppen; um 1,0–1,3 ppm ca. 15 Protonen; 0,7 ppm ($J = 5,5$ Hz, 1 G); OH (austauschbar) bei 2,5 und 5,0 ppm.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft haben wir für eine Sachbeihilfe zu danken. Ultramikroanalysen nach Walisch verdanken wir Herrn Dr. H. REIMLINGER, Brüssel, circulardichroitische Messungen Herrn Doz. Dr. G. SNATZKE, Bonn. KMR-Spektren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. J. SONNENBICHLER, München und Herrn Dr. A. MELERA, Zürich, aufgenommen. Elektronenstoß-Massenspektren verdanken wir Herrn Prof. Dr. G. SPITELLER, vormals Wien, und Herrn Prof. Dr. F. WEYGAND, München. Für Elektronenanlagerungs-Massenspektren danken wir Herrn Prof. Dr. M. v. ARDENNE, Dresden.

³¹ J. S. MATHEWS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **69**, 163 [1963].