Zur Chemie des Phorbols, XII

Phorbobutanon

H. BARTSCH* und E. HECKER

Biochemisches Institut des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg

(Z. Naturforschg. **24 b**, 99—106 [1969]; eingegangen am 19. Oktober 1968)

Dehydration of phorbol-20-monoacetate or phorbol-20-tritylether with phosphoroxchloride/pyridin yields phorbobutanon-20-monoacetate or -20-tritylether (**1**) respectively. From **1** phorbobutanon (**2**) is prepared. **2** is one of the products obtained from the reaction of phorbol with 0,02 N sulfuric acid (Flaschenträger reaction). From NMR- and CD-measurements of **2** and its derivatives and from mechanistic considerations of the pinacol rearrangement involving the α -[hydroxy-cyclopropyl]-carbinol group the structure and stereochemistry of phorbobutanon is derived. **2** is a 4,9,20-trihydroxy-14 (13 $\rightarrow$ 12) abeo-tigliadien-(1,6)-dion-(3,13).

Wie bereits kurz mitgeteilt²⁻⁴, führt die Umsetzung von Phorbol-20-monoacetat⁵⁻⁷ mit Phosphoroxchlorid/Pyridin zu Phorbobutanon-20-monoacetat. Phorbol-Derivate mit geschützter Hydroxylgruppe in Position 12 wie Phorbol-12.13.20-triacetat⁸ oder Phorbol-12.20-diacetat^{5,6} können mit Phosphoroxchlorid nicht zu Phorbobutanon-Derivaten umgesetzt werden (vgl. l.c.⁴). Aus Untersuchungen zum Mechanismus der oben genannten Reaktion sowie aus den spektralen Daten der beteiligten Verbindungen lassen sich die Struktur und Stereochemie des Phorbobutanons und seiner Derivate ableiten. Sie lieferten einen wichtigen Beitrag zur Strukturaufklärung des Phorbols²⁻⁴.

Phorbobutanon

Setzt man Phorbol-20-trityläther⁹ mit Phosphoroxchlorid/Pyridin bei 0° um, so erhält man, neben wenigen Produkten sehr kleinen *R_f*-Werts (Phosphorsäureester), ein Hauptprodukt, dessen spektrale

Daten einem 20-Trityläther mit verändertem Kohlenstoffskelett (**1**) entsprechen. Der Tritylrest läßt sich durch kurzzeitiges Erhitzen mit wäßriger Essigsäure⁹ abspalten. Man erhält das kristalline Spaltprodukt **2**, das mit Acetanhydrid/Pyridin ein Monoacetat **3** liefert. Dieses ist mit dem eingangs erwähnten Phorbobutanon-20-monoacetat⁴⁻⁶ identisch. In entsprechender Reaktion erhält man aus **2** mit Benzoylchlorid/Pyridin ein Phorbobutanon-20-mono-benzoat (**4**).

Abb. 1. Fragmentierung von Phorbobutanon im Elektronenstoß-Massenspektrum; Molekülion bei $m/e = 346$; durch metastabile Ionen belegte Übergänge sind mit * versehen.

* Teil der Dissertation H. BARTSCH, Heidelberg 1968.

¹ XI. Mitt.: H. BARTSCH u. E. HECKER, Z. Naturforschg. **24 b**, 91 [1969].

² Über einen Teil der hier ausführlich mitgeteilten Ergebnisse wurde bereits berichtet: E. HECKER, Vorträge Marburger Chemische Gesellschaft, 20. 5. 1966, Gesellschaft Deutscher Chemiker, Ortsverband Göttingen, 16. 6. 1966, Max-Planck-Institut für Biochemie, München, 4. 10. 1966, Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, 13. bis 15. 10. 1966 Marburg, IX. Internationaler Krebskongreß, 23.—29. 10. 1966, Tokyo sowie Chester Beatty Institute for Cancer Research, London, 11. 1. 1967 (vgl. Naturwissenschaften **54**, 282 [1967]).

³ H. BARTSCH u. E. HECKER, 100. Jahrestagung Gesellschaft Deutscher Chemiker, Berlin, 18.—23. 9. 1967, vgl. Angew. Chem. **79**, 994 [1967]; Angew. Chem. Internat. Ed. **6**, 974 [1967] und 2. Symposium des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg, 25.—27. 9. 1967, vgl. „Aktuelle Pro-

bleme aus dem Gebiet der Cancerologie“, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1968, S. 162.

⁴ E. HECKER, H. BARTSCH, M. GSCHWENDT, E. HÄRLE, G. KREIBICH, H. KUBINYI, H. U. SCHAIRER, CH. v. SZCZEPANSKI u. H. W. THIELMANN, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 3165.

⁵ E. HECKER, H. KUBINYI, H. BRESCH, CH. v. SZCZEPANSKI u. E. HÄRLE, Tetrahedron Letters [London] **23**, 1837 [1965].

⁶ 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].

⁷ CH. v. SZCZEPANSKI, H. U. SCHAIRER, M. GSCHWENDT u. E. HECKER, Liebigs Ann. Chem. **705**, 199 [1967].

⁸ E. HECKER, CH. v. SZCZEPANSKI, H. KUBINYI, H. BRESCH, E. HÄRLE, H. U. SCHAIRER u. H. BARTSCH, Z. Naturforschg. **21 b**, 1204 [1966].

⁹ G. KREIBICH u. E. HECKER, Z. Naturforschg. **23 b**, 1444 [1968].

Elementaranalyse und Massenspektrum (Abb. 1) ergeben für Phorbobutanon (**2**) die Bruttoformel $C_{20}H_{26}O_5$, die auch durch die 20-Mono-ester **3** und **4** bestätigt wird. **2** ist daher formal ein Dehydratisierungs-Produkt des Phorbols $C_{20}H_{28}O_6$.

Im UV-Spektrum von **2** findet sich — ähnlich wie im Phorbol — die $n-\pi^*$ -Bande einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe bei 227 nm (ϵ 5600) sowie eine breite Schulter um 310 nm (ϵ 77). Im UV-Spektrum von Phorbobutanon-20-monoacetat (**3**) tritt dagegen eine deutlichere $n-\pi^*$ -Bande getrennt in zwei Maxima bei 311 und 330 nm auf. Das IR-Spektrum von **2** zeigt im Carbonylbereich eine Absorptionsbande bei 1710 cm^{-1} sowie eine weitere Bande bei auffällig hohen Wellenzahlen (1762 cm^{-1}). Die letztere liegt in dem durch katalytische Hydrierung von Phorbobutanon-20-monobenzoat zugänglichen 20-Desoxy-tetrahydrophorbobutanon (**5**) bei 1758 cm^{-1} . Diese Carbonylbande, die im Bereich der Absorption von Cyclobutanonen¹⁰ liegt, und die Tatsache, daß Phorbol-12.20-diacetat kein Cyclobutanon-Derivat ergibt, ließ zusammen mit anderen Befunden vermuten⁴⁻⁶, daß Phorbol eine α -[Hydroxycyclopropyl]-carbinol-Gruppierung enthält.

Die im Massenspektrum von α,α' -Dimethyl-cyclobutanonen beobachtete charakteristische Abspaltung von 70 Masseneinheiten^{11, 12} tritt indessen bei Phorbobutanon (**2**) nicht auf (vgl. Abb. 1). Vielmehr findet man, ausgehend von Fragmentation *M*-18, lediglich die Massendifferenz 69.

Phorbobutanon (**2**) kann außer durch die oben beschriebene gezielte Darstellungsweise auch als eines der Produkte der „Flaschenträger-Reaktion“^{4, 13} (Behandlung von Phorbol mit 0,02-n. Schwefelsäure in der Wärme¹⁴) erhalten werden. Da die Wasserabspaltung aus Phorbol-20-trityläther auch bei Aufarbeitung des Reaktionsansatzes mit Methanol an Stelle von Wasser keine methoxylierten Produkte ergibt, muß eine intramolekular verlaufende Umlagerung, eine Pinakolumlagerung der sekundär-tertiären Glykolgruppierung des Phorbols, vorliegen. Dabei sind ausgehend von Phorbol (**4**) bzw. Phorbol-20-trityläther zwei Umlagerungsprodukte **7** bzw. **8** zu erwarten (vgl. Formelschema), je nachdem ob die Bindung 13,14 oder

13,15 des Dreirings anionisch wandert. Die Entscheidung kann durch KMR- und CD-Messungen (vgl. unten) gefällt werden: Die für **7** zu erwartende Sequenz C-11, 12, 14, 8, 7 läßt sich im Phorbobutanon-20-monobenzoat durch kernmagnetische Doppelresonanzmessungen nachweisen (vgl. Tab. 1). Damit ist **8** ausgeschlossen.

Die Verschiebung des Signals von H-14 nach niedrigerem Feld bestätigt die Öffnung des Dreirings in **7**. Die chemische Verschiebung (3,48 ppm, Phorbobutanon-20-monobenzoat) entspricht einem zu einer Carbonylgruppe α -ständigen Wasserstoffatom in Cyclobutanonen^{11, 15}. Die Signale der beiden geminalen Methylgruppen am Vierring erscheinen im Phorbobutanon (in d_6 -DMSO) bei 1,00 und 1,30 ppm. Dieser große Unterschied in der chemischen Verschiebung kann als asymmetrische Abschirmung durch die Carbonylgruppe an C-13 verstanden werden und tritt auch bei in der Literatur beschriebenen α,α' -Dimethyl-cyclobutanonen auf¹⁶.

Durch kernmagnetische Doppelresonanzmessungen (vgl. Tab. 1) sowie unter Berücksichtigung der UV- und IR-Daten lassen sich die unveränderten Sequenzen des Phorbols C-10, 1, 2, 3 sowie C-11, 18 nachweisen. Somit ergibt sich für Phorbobutanon die Struktur **2**.

¹⁰ C. L. R. RAO, Chemical Application of IR-Spectroscopy, Academic Press, New York, London 1963.

¹¹ J. M. CONIA, Ind. chim. belge **10**, 981 [1966].

¹² J. J. BEERENBOOM, J. org. Chemistry **30** (12), 4230 [1965].

¹³ H. W. THIELMANN u. E. HECKER, in Vorbereitung.

¹⁴ B. FLASCHENTRÄGER u. F. V. FALKENHAUSEN, Liebigs Ann. Chem. **514**, 252 [1934].

¹⁵ C. MARTIN et al., J. org. Chemistry **30** (12), 4309 [1965].

¹⁶ J. M. CONIA u. J. GORE, Bull. Soc. chim. France **1964**, 1968.

Die circulardichroitische Absorption des Phorbobutanons bei 307 nm ($\Delta\epsilon = -3,44$) beweist das Vorliegen eines zweiten, gesättigten Carbonyls. Seine Absorption ist durch die $n-\pi^*$ -Bande des Cyclopentenons überlagert, die als Inflexion bei 343 nm zu erkennen ist; ein Absorptionsmaximum um 268 nm das — wie im Phorbol^{3,8} — nicht zugeordnet werden kann, tritt auch hier deutlich hervor.

Setzt man voraus, daß eine elektronische Wechselwirkung der Carbonyle, ihrer Anordnung in **2** zufolge, unterbleibt, so ergibt sich die maximale dichroitische Eigenabsorption des Cyclobutanons als Differenz der Absorption von Phorbobutanon und Phorbol bei 307 nm. Man erhält damit $\Delta\epsilon_{307} = -3,31$.

Der Circulardichroismus von α,α' -Dimethyl-cyclobutanonen nimmt durch den verschieden großen Beitrag der pseudo-äquatorialen und pseudo-axialen Methylgruppe bei nicht ebener Konformation des Vierrings Werte von $\Delta\epsilon < 1$ an¹⁶. Die hohe Eigenabsorption $\Delta\epsilon_{307} = -3,31$ des Phorbobutanons muß deshalb von den Beiträgen des restlichen Kohlenstoffskeletts herrühren.

Die bereits auf Grund der KMR-Messungen ausgeschiedene Struktur **8** ist auch auf Grund der CD-Daten auszuschließen, wenn man das Octantendiagramm anwendet^{11,16,17}. In diesem liegen von den 20 Kohlenstoffatomen sieben im positiven, fünf im negativen Quadranten und der Rest in den Knotenebenen. Als resultierender Beitrag verbleiben — unabhängig von der absoluten Konfiguration des Moleküls — die Inkremente zweier C-Atome, die den hohen Absolutwert der dichroitischen Absorption nicht erklären können.

eingestrahlt bei [ppm]	beobachtet bei [ppm]	Änderung der Multiplizität J in cps	aufgehobene Kopplung J in cps
H-1: 7,42*	H-10: 2,90	M $\rightarrow$ D ($J = 3$)	?***
H-1: 7,42	H ₃ -19: 1,80	M $\rightarrow$ D ($J = 3$)	?
H-11: 2,53*	H ₃ -18: 1,18	D $\rightarrow$ S	$J_{11,18} = 7$
H-7: 5,88	H-8: 3,86	DD $\rightarrow$ D ($J = 10,5$)	$J_{7,8} = 5$
H-8: 3,86	H-7: 5,88	D $\rightarrow$ S	$J_{7,8} = 5$
H-8: 3,86	H-14: 2,55**	DD $\rightarrow$ D ($J = 9$)	$J_{8,14} = 10,5$
H-14: 2,55	H-12: 3,48	DD $\rightarrow$ D ($J = 6$)	$J_{12,14} = 9$
H ₂ -20: 4,72	H-7: 5,88	Verschärfung (long-range)	?

Tab. 1. Kernmagnetische Doppelresonanzmessungen an Phorbobutanon-20-monobenzoat (**4**) in $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$. * Überlagert, ** teilweise überlagert, *** nicht eindeutig aus dem Spektrum entnehmbare Kopplungskonstanten sind als ? gekennzeichnet.

Die absolute Konfiguration an C-4, 8, 9, 10, 11 kann vom Phorbol^{18,19} auf Phorbobutanon (**2**) übertragen werden, da bei der Bildungsreaktion die Stereochemie der genannten Asymmetriezentren nicht verändert wird (vgl. auch Tab. 2).

Kopplungs- konstante J	Phorbol [cps]	Phorbobutanon- 20-monobenzoat [cps]
$J_{1,10}$	ca. 1	ca. 1
$J_{10,19}$	2	3
$J_{7,8}$	6	5
$J_{11,18}$	7	7
$J_{8,14}$	6	10,5
$J_{11,12}$	11	6
$J_{12,14}$	—	9,2

Tab. 2. Kopplungskonstanten des Phorbols und des Phorbobutanons, die deren Konformation bestimmen, durch KMR-Doppelresonanz (100 MHz) ermittelt.

Wegen der allein möglichen *cis*-Verknüpfung von Fünf- und Vierring — die durch die Kopplungskonstante $J_{12,14} = 9,2$ cps (Tab. 2) bestätigt wird — kann der Butanring nur in den Konfigurationen **9** oder **10** vorliegen. Auf Grund der Kopplungskonstanten $J_{8,14} = 10,5$ cps und $J_{11,12} = 6$ cps (Tab. 2) allein kann keine eindeutige Entscheidung zwischen **9** und **10** gefällt werden. Der Bildungsmechanismus von Phorbobutanon läßt aber an C-14 keine Konfigurationsumkehr erwarten. Danach wäre für Phorbobutanon die Konfiguration **9** anzunehmen.

Mit Hilfe der CD-Daten läßt sich eine der beiden Strukturen ausschließen: In Abb. 2 sind die Octantenprojektionen von Phorbobutanon mit einem β -ständigen Vierring (**9**) und einem α -ständigen

¹⁷ P. CRABBÉ, Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry, Holden-Day, San Francisco 1965, S. 83.

¹⁸ 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. Ed. **6**, 809 [1967].

¹⁹ M. GSCHWENDT u. E. HECKER, Z. Naturforsch. **23b**, 1584 [1968].

Abb. 2. Octantenprojektion von Phorbobutanon mit β -ständigem Vierring (9) und α -ständigem Vierring (10) unter Berücksichtigung der absoluten Konfiguration von C-4, 8, 9, 10, 11 des Phorbols.

Vierring (10) wiedergegeben. Nach der Bilanz der vorzeichenbestimmenden Beiträge ist nur die Struktur 9 mit dem gemessenen Circular dichroismus des Phorbobutanons vereinbar.

Für Phorbobutanon ergibt sich somit die in 2a bzw. 2b wiedergegebene räumliche Struktur: Phorbobutanon ist ein 4.9.20-Trihydroxy-14(13 $\rightarrow$ 12)-abeo-tigliadien-(1.6)-dion-(3.13) mit gegenüber Phorbol unveränderter Konfiguration an C-12 und C-14.

Die Dehydrierung von Phorbobutanon mit Palladium auf Tierkohle bzw. mit Selen ergibt unter gleichen Reaktionsbedingungen wie beim Phorbol²⁰ ein Gemisch von Azulen. Drei seiner Komponenten sind in R_f -Wert, Farbe und Feinstruktur der UV-Spektren mit den aus Phorbol erhaltenen Azulen γ , δ_1 und δ_2 ²⁰ identisch. Phorbobutanon könnte daher als eine Vorstufe der Azulenbildung aus Phorbol betrachtet werden.

Phorbobutanon-20-monobenzoat (4) läßt sich mit Natriumborhydrid in eine harzartige Verbindung (11) überführen, in der nach den spektralen Daten beide Carbonylgruppen reduziert sind. Als Nebenprodukt mit größerem R_f -Wert wird eine kristalline Substanz 12 isoliert, in der nach KMR-, IR- und UV-Spektrum die Carbonylgruppe in 3-Stellung reduziert wurde. Da diese Carbonylgruppe in allen bisher untersuchten Phorbol-Derivaten leicht reduziert werden kann, wird für 12 für ein Monoketon mit intakter Cyclobutangruppierung angenommen.

Beschreibung der Versuche

Allgemeines: vgl. l. c.²¹

Die Aufarbeitung einzelner Reaktionsansätze erfolgt nach einer gleichbleibenden Vorschrift.

a) Wird Pyridin als Katalysator oder Lösungsmittel bei einer Reaktion verwandt, so wird das Reaktionsgemisch in das doppelte Volumen Wasser gegossen, das ausgefallene Reaktionsprodukt in Methylenchlorid oder Essigester aufgenommen und die wäßrige Phase mindestens 4-mal mit einer ausreichenden Menge organischen Lösungsmittels ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 1-n. HCl frei von Pyridin gewaschen und mit wäßriger 5-proz. KHCO_3 -Lösung säurefrei geschüttelt. Nach dem Waschen mit Wasser wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen.

b) Bei Reaktionsgemischen, die kein Pyridin enthalten, wird nicht mit HCl gewaschen, sonst aber wie unter a) verfahren.

Soweit nicht die chemischen Symbole selbst kurz sind (z. B. CCl_4 , CHCl_3 , CH_2Cl_2) werden häufig verwendete Lösungsmittel bzw. Reagenzien wie folgt abgekürzt: Aceton (A), Benzol (B), Cyclohexan (Cyclo), Essigester (EE), Pyridin (Py), Vanillin/Schwefelsäure (V/S).

Reaktion von Phorbol-12.20-diacetat mit POCl_3 in Pyridin: 105 mg (0,23 mMol) Phorbol-12.20-diacetat

²⁰ E. HÄRLE, W. KOCH u. E. HECKER, Chem. Ber. **100**, 795 [1967].

²¹ H. U. SCHAIRER, H. W. THIELMANN, M. GSCHWENDT, G. KREIBICH, R. SCHMIDT u. E. HECKER, Z. Naturforsch. **23b**, 1430 [1968].

werden in 2 ml Py gelöst und mit 0,08 ml (0,87 mMol) POCl_3 unter Rühren bei 0 °C versetzt. Nach 76 Min. wird 3 ml Eiswasser zugesetzt. Auf der Kieselgeldünnschicht ist kein Ausgangsmaterial mehr nachzuweisen. Man beobachtet als einziges Reaktionsprodukt einen stark polaren Phosphorsäureester, der sich mit V/S braun anfärben läßt.

Phosphatnachweis bei der Reaktion von Phorbol-12-20-diacetat mit POCl_3 : Das Ausbleiben eines positiven Phosphatnachweises, der in der wäßrigen Phase der Reaktionslösung mit Ammoniummolybdat ausgeführt wird (s. weiter unten), zeigt das quantitative Eintreten von 2–3 Molekülen POCl_3 pro Molekül Phorbol-12-20-diacetat. Unter Hydrolysebedingungen entsteht daraus der polare Phosphorsäureester.

Phorbol-20-trityläther: 3 g (8,2 mMol) Wasserphorbol und 12 g (43 mMol) Tritylchlorid werden in 120 ml abs. Py gelöst, 20 Stdn. bei Raumtemperatur belassen und danach in 650 ml H_2O geschüttet. Nach Extrahieren mit EE wird nach Vorschrift a aufgearbeitet. Die Säulenchromatographie des Trockenrückstands (14,1 g) an 500 g $\text{SiO}_2/13\% \text{H}_2\text{O}$ mit den Systemen Benzol und B/EE = 1/2 ergibt 3,837 g (77% d. Th.) Phorbol-20-trityläther.

R_f -Wert: 0,36 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 1/1$; Anfärbung mit V/S: gelbbraun.

Phorbobutanon-20-trityläther (1): 3,873 g (6,35 mMol) Phorbol-20-trityläther werden in 50 ml abs. Py gelöst und tropfenweise mit 2,8 ml POCl_3 (30,6 mMol) unter Eiskühlung und Rühren versetzt. Nach 150 Min. werden 50 ml H_2O zugesetzt und nach Vorschrift a aufgearbeitet. Auf der Kieselgeldünnschicht lassen sich neben dem Hauptprodukt 1 und einer Substanz am Start (vgl. weiter unten) keine weiteren Reaktionsprodukte nachweisen. Die Säulenchromatographie an 300 g $\text{SiO}_2/13\% \text{H}_2\text{O}$ mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 95/5$ ergibt 1,154 g (32% d. Th.) Substanz, die nach zweimaliger Umkristallisation aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PÄ}$ farblose Kristalle vom Schmp. 224–226 °C liefert.

R_f -Wert 0,46 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 8/1$; Anfärbung mit V/S: gelbgrün; $[\alpha]_{546}^{24} = 17^\circ$, $[\alpha]_{578}^{24} = 16$ (1%, Dioxan).

$\text{C}_{39}\text{H}_{40}\text{O}_5$ (588,75)

Ber. C 79,56 H 6,25,

Gef. C 79,20 H 6,85.

MS: höchste Massenspitze bei $m/e = 346$ ($M - 243$)
243 $\equiv$ Tritylrest.

KMR (d_5 -Pyridin): H-1 und 15 aromatische Protonen bei 7,8–7,1; H-7 6,2 (D; $J_{7,8} = 6$ cps); H-8 4,62 (?); H₂-20 3,64 (S); H*-10, 14, 11,5 ca. 3,5–2,4 (nicht zuzuordnen); H₃-19 1,8 (M); H₃-18 1,42 (D; $J_{11,18} = 7$ cps); H₃-17 1,28 (S); H₃-16 1,28 (S); OH (austauschbar): 5,9 ppm.

* Überlagert.

IR (KBr): $\nu_{\text{O-H}}$ 3530, 3410; $\nu_{\text{C=O}}$ 1750, 1700;
 $\nu_{\text{C=C, konj.}}$ 1623 cm^{-1} .

IR (CH_2Cl_2): $\nu_{\text{O-H}}$ 3670, 3560; $\nu_{\text{C=O}}$ 1762, 1705;
 $\nu_{\text{C=C, konj.}}$ 1629 cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (260), (310), (330) nm; ϵ (3000), (80), (60).

Phosphatnachweis in den Nebenprodukten der Reaktion Phorbol-20-trityläther $\rightarrow$ Phorbobutanon-20-trityläther: Die Nebenprodukte der Bildungsreaktion von Phorbobutanon-20-trityläther werden mit Methanol von der Säule gewaschen. Auf der Kieselgeldünnschicht sind drei Substanzen zu erkennen, die im System Methanol/ $\text{A} = 1/1$ die R_f -Werte 0,88; 0,4 und 0,18 aufweisen und stärker polar als Phorbol ($R_f = \text{ca. } 1$) sind. Das am stärksten polare Produkt (A) entsteht mit der größten Ausbeute. Es wird über präp. Dickschichtchromatographie mit Methanol/ $\text{A} = 1/1$ abgetrennt, mit Methanol vom Kieselgel gelöst und das Lösungsmittel abgezogen.

Phosphatnachweis mit Ammoniummolybdat: Einige mg A werden 2 Min. lang mit 60-proz. wäßriger HNO_3 erhitzt und in der Kälte mit Ammoniummolybdat-Reagenz** versetzt. Der gelbe, in organischen Lösungsmitteln unlösliche Niederschlag beweist einen entstandenen polaren Phosphorsäureester eines an der Reaktion beteiligten Phorbol-Derivats.

Phosphatnachweis mit Zirkonylchlorid: Eine Spatelspitze A wird in 5 ml wäßriger HCl ($\text{pH} = 1$) aufgelöst und mit 10 ml wäßriger Zirkonylchlorid-Lösung in der Kälte versetzt. Es entsteht kein Niederschlag. Erst nach Erhitzen mit 60-proz. HNO_3 wird der Phosphorsäureester verseift, und farbloses Zirkonylphosphat fällt aus.

Phorbobutanon-20-trityläther aus Phorbol-20-trityläther mit POCl_3 /Pyridin in absolutem Methanol: 1510 mg (2,50 mMol) Phorbol-20-trityläther werden in 19 ml abs. Py gelöst und mit 1,1 ml (12 mMol) POCl_3 bei 0 °C unter Rühren versetzt. Nach 2 Stdn. werden 20 ml abs. Methanol zugesetzt und nach 2 Stdn. wird nach Vorschrift a aufgearbeitet. Die Säulenchromatographie an 200 g $\text{SiO}_2/13\% \text{H}_2\text{O}$ mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 95/5$ liefert 420 mg (29% d. Th.) Substanz.

R_f -Wert 0,46 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 8/1$; Anfärbung mit V/S: gelbgrün.

IR (CH_2Cl_2): $\nu_{\text{O-H}}$ 3670, 3560; $\nu_{\text{C=O}}$ 1762, 1705;
 $\nu_{\text{C=C, konj.}}$ 1629 cm^{-1} .

Phorbobutanon [4.9.20-Trihydroxy-14(13 $\rightarrow$ 12)abeotigliadien-(1.6)-dion-(3.13)] (2): 2,835 g (4,81 mMol) Phorbobutanon-20-trityläther (1) werden in 300 ml siedender, 80-proz. wäßriger Essigsäure unter Rühren 3 Min. erhitzt, danach der Ansatz in 220 ml ges. wäßrige Natriumacetat-Lösung geschüttet und mit EE extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt nach Vorschrift a. Die Säulenchromatographie an 300 g $\text{SiO}_2/13\% \text{H}_2\text{O}$ mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 95/5$, 1/1, 3/7 ergibt 1,10 g (66,4% d. Th.) Substanz. Zweimaliges Umkristallisieren aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A}/\text{CCl}_4 = 1/1/1$ liefert 391 mg Kristalle, die unter Braunfärbung bei 213–215 °C schmelzen.

R_f -Wert: 0,42 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 1/1$; 0,25 in EE; Anfärbung mit V/S: grün; $[\alpha]_{546}^{24} = -6^\circ$, $[\alpha]_{578}^{24} = 0^\circ$ (1%, Dioxan).

$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_5$ (346,4)

Ber. C 69,34 H 7,56,

Gef. C 68,87 H 7,40.

** 100 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{21} \cdot 4 \text{H}_2\text{O} + 200 \text{ g } \text{NH}_4\text{NO}_3 + 70 \text{ ml conc. NH}_4\text{OH}$ mit H_2O auf 1000 ml aufgefüllt.

MS: Die rel. Intensitäten (I) bezogen auf $m/e = 28$ (100%); es werden angegeben: bis $m/e = 69$

$I > 30\%$; bis $m/e = 241$ $I > 10\%$; bis $m/e = 329$ $I > 2\%$; bis $m/e = 342$ $I > 0,06$ Prozent;

m/e	347	346	345	344	343	342	341	329	328	312
$I[\%]$	0,2	1,0	0,18	0,57	0,18	0,3	0,25	12	51	3
m/e	310	301	300	285	283	282	267	260	259	258
$I[\%]$	7	2	10	11	2	4	5	5	28	5
m/e	257	241	240	214	213	212	211	189	179	162
$I[\%]$	4	10	12	13	18	10	11	17	19	12
m/e	161	159	147	145	137	124	123	122	121	120
$I[\%]$	11	11	10	10	12	14	18	24	53	12
m/e	109	108	107	105	69	55	43	41	32	28
$I[\%]$	37	11	41	17	74	36	47	57	74	100

zugeordnete metastabile Ionen: $(313)^2/328 = 298,6$; $(310)^2/328 = 292,9$; $(285)^2/328 = 247,6$; $(241)^2/259 = 225,2$.

KMR (d_6 -DMSO): H-1 7,50; H-7 5,68 (D; $J_{7,8} = 5$ cps); H₂-20 3,85 (S); H*-8 und H*-12 ca. 3,72–3,3; H-10 2,80; H*-14, H-11, H-5 ca. 2,6–2,25; H₃-19 1,80 (M); H₃-17 1,30 (S); H₃-18 1,08 (D; $J_{11,18} = 7$ cps); H₃-16 1,00 (S); OH (austauschbar) 4,50 (breit), 2,40 ppm.

* Überlagert.

IR (KBr): ν_{O-H} 3630, 3520; $\nu_{C=O}$ 1762, 1710; $\nu_{C=C, \text{konj.}}$ 1630 cm^{-1} .

IR (Acetonitril): ν_{O-H} 3530, 3450, 3360; $\nu_{C=O}$ 1762, 1685; $\nu_{C=C, \text{konj.}}$ 1629 cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (227), (310), (330) nm; ϵ (5600), (77), (60).

CD (Dioxan, 20°): 390 (0); 3,43 i (–0,39); 307 (–3,44); 275 (–0,87); 268 (–1,1); 260 (–0,43) nm.

Phorbobutanon-20-monoacetat (3): 140 mg (0,40 mMol) Phorbobutanon (2) werden in 2,1 ml Py gelöst, mit 0,7 ml Acetanhydrid (6,54 mMol) 15 Stdn. bei Raumtemperatur belassen und nach Vorschrift a aufgearbeitet. Die Säulenchromatographie an 100 g SiO₂/13% H₂O mit CH₂Cl₂/Ä = 95/5 liefert 154 mg (98% d. Th.) Substanz, die durch Umkristallisation aus Cyclo/PÄ/Ä = 1/1/1 in 94 mg Kristalle vom Schmp. 162–163 °C überführt wird.

R_f -Wert: 0,40 in CH₂Cl₂/A = 8/1; Anfärbung mit V/S: grün; $[\alpha]_{546}^{24} = -6^\circ$; $[\alpha]_{578}^{24} = 0^\circ$ (1%, Dioxan).

C₂₂H₂₈O₆ (388,5)

Ber. C 68,02 H 7,26,

Gef. C 68,11 H 7,25.

KMR (CDCl₃): H-1 7,42 (M); H-7 5,88 (D; $J_{7,8} = 5$ cps); H₂-20 4,50 (S); H-8 3,86 (DD; $J_{7,8} = 5,2$ cps; $J_{8,14} = 10,5$ cps); H-12 3,48 (DD; $J_{12,14} = 9$ cps; $J_{11,12} = 6$ cps); H-10 2,90 (M); H*-14 2,55 (DD; $J = \text{ca. } 9$ cps); H*-11 2,4–2,62; H₂*-5 2,4–2,62; H₃-19 1,82 (M); H₃-17 1,31 (S); H₃-18 1,18 (D; $J_{11,18} = 7$ cps); H₃-16 1,04 (S); COCH₃ 2,06; OH (austauschbar) 3,06; 1,84 ppm.

* Teilweise überlagert.

IR (CH₂Cl₂): ν_{O-H} 3560; $\nu_{C=O}$ 1762, 1730, 1709; $\nu_{C=C, \text{konj.}}$ 1630 cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (230), 306, (330) nm; ϵ (3060), 86, (65).

UV (CH₂Cl₂): λ_{max} 311, 330 nm; ϵ 70, 54.

Phorbobutanon-20-monobenzoat (4): 500 mg (1,45 mMol) Phorbobutanon (2) werden in 10 ml Py gelöst, mit 0,85 ml Benzoylchlorid versetzt, 17 Stdn. bei Raumtemperatur belassen, danach mit 100 ml H₂O unter Rühren versetzt und nach 10 Stdn. nach Vorschrift a aufgearbeitet. Die Auftrennung über präp. Dickschicht mit CH₂Cl₂/A = 10/1 ergibt 546 mg Substanz, die nach zweimaligem Umkristallisieren aus CH₂Cl₂/Ä/PÄ = 1/1/1 Nadeln vom Schmp. 194–195,5 °C liefert.

R_f -Wert: 0,62 in CH₂Cl₂/A = 4/1; Anfärbung mit V/S: grün; $[\alpha]_{546}^{24} = -3^\circ$; $[\alpha]_{578}^{24} = 0^\circ$ (1%, Dioxan).

C₂₇H₃₀O₆ (450,5)

Ber. C 71,98 H 6,71,

Gef. C 71,40 H 6,58.

MS: Molekülion $m/e = 450$.

KMR (CDCl₃): H₂ (aromat.) 8,0; H₃ (aromat.) 7,35 bis 7,55; H*-1 7,42; H-7 5,88 (D; $J_{7,8} = 5,2$ cps); H₂-20 4,72 (S); H-8 3,86 (DD; $J_{7,8} = 5,2$ cps; $J_{8,14} = 10,4$ cps); H-12 3,48 (DD; $J_{12,14} = 6$ cps); H-10 2,90 (M; $J_{10,19} = 3$ cps); H*-14 2,55; H*-11 2,53 (M); H₂*-5 ca. 2,5; H₃-19 1,80 (M; $J_{10,19} = 3$ cps); H₃-17 1,31 (S); H₃-18 1,18 (D; $J_{11,18} = 7$ cps); H₃-16 1,08 (S); OH (austauschbar): 3,0; 1,82 ppm.

* Überlagert.

IR (KBr): ν_{O-H} 3470 (scharf), 3290 (breit); $\nu_{C=O}$ 1760, 1705; $\nu_{C=C, \text{konj.}}$ 1620; $\nu_{C=C, \text{aromat.}}$ 1655, 1590, 1575 cm^{-1} .

IR (CH₂Cl₂): ν_{O-H} 3560; $\nu_{C=O}$ 1760, 1705 i; $\nu_{C=C, \text{konj.}}$ 1623 cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} 226, (278), (302), (332) nm; ϵ 20700, (1100), (72), (62).

20-Desoxy-tetrahydrophorbobutanon (5): 100 mg (0,22 mMol) Phorbobutanon-20-monobenzoat (4) werden in 25 ml EE gelöst und in Gegenwart von 200 mg Palladium/Tierkohle (EE vorhydriert, 10% Pd) bei 30 °C und Atmosphärendruck hydriert, wobei 0,79 mMol H₂ verbraucht wird. Nach dem Filtrieren und Abziehen des Lösungsmittels verbleibt 75 mg Rückstand, der

nach Reinigung über präp. Dickschichtchromatographie (System $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 8/1$) 60 mg (89% d. Th.) Substanz ergibt, die nach dem Umkristallisieren aus $\text{PÄ}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Ä} = 1/1/1$ 32 mg Kristalle vom Schmp. 214–217 °C liefert.

R_f -Wert: 0,62 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 4/1$; Anfärbung mit V/S: olivgrün; $[\alpha]_{546}^{24} = 1^\circ$; $[\alpha]_{578}^{24} = 0^\circ$ (1%, Dioxan).

MS: Molekülion $m/e = 334$.

KMR (CDCl_3): H-12 3,32 (DD; $J_{12,14} = 10$ cps, $J_{11,12} = 6$ cps); aliphatische Protonen 2,8–1,4; 5 Methylgruppen 1,35–1,0; OH (austauschbar): 1,95, 1,62 ppm.

IR (CH_2Cl_2): $\nu_{\text{O-H}}$ 3560; $\nu_{\text{C=O}}$ 1758, 1735 cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (220), 302 nm; ϵ (1290), 80.

CD (Dioxan 20°): 350 (0), 328 (+1,75), 318 (0), 299 (–2,17), 250 (0) nm.

Azulene γ , δ_1 und δ_2 aus Phorbobutanon: 23 mg Phorbobutanon allein sowie vermengt mit der gleichen Gewichtsmenge Palladium auf Tierkohle bzw. Se werden in einem geschlossenen Glasrohr (6–7 mm Durchmesser) bei 12 Torr in einem Metallbad von 300 bis 320 °C trocken erhitzt. Im kühlen Teil des Rohres schlägt sich allmählich ein graugrünes Harz nieder. Diese Zone der sublimierten Azulene wird im Glas herausgeschnitten und in Cyclo gelöst. Auf der Kieselgeldünnschicht im System Cyclohexan/B = 20:1 zeigt der Ansatz mit Pd/Tierkohle die größte Ausbeute. Aus dem Azulengemisch läßt sich Azulen γ durch Säulenchromatographie an 20 g $\text{SiO}_2/13\%$ H_2O mit Cyclohexan abtrennen. Das Gemisch der Azulene δ_1 und δ_2 wird mit Cyclohexan/B = 40/1 von der Säule gewaschen und durch präp. Dickschichtchromatographie mit B/EE = 20/1 aufgetrennt.

Azulen	γ	δ_1	δ_2
R_f -Wert*	0,36	0,32	0,29
Farbe	blau	blaugrün	blauviolett
ungefähre Ausbeuten** in mg	1	0,5	0,26

* In B/EE = 20/1, ** auf die vereinigten Dehydrierungsansätze mit Se bzw. Pd/Tierkohle bezogen.

UV (Cyclohexan): Azulen γ : λ_{max} 277, 248, 287, 297, 313, 327, (355 i), 370, (378 i), 388, (398 i), 600, (615 i), (650 i) nm.

Azulen δ_1 : λ_{max} 230, 265, 306, 330, 375, 390, 410, 580, 615, (675 i) nm.

Azulen δ_2 : λ_{max} 225, 255, (295 i), (298 i), 306, 335, 380, 410, 560, 615, 675 nm.

Referenz-Substanzen²⁰ zeigen identische R_f -Werte, Farbe und Feinstruktur im UV-Spektrum.

Reduktion von Phorbobutanon: 1000 mg (2,52 mMol) Phorbobutanon werden in 111 ml Tetrahydrofuran und 8,5 ml *i*-Propanol gelöst und mit 410 mg (10,3 mMol) NaBH_4 5 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 9 ml Eisessig abgebrochen und nach Vorschrift b aufgearbeitet. Auf der Kieselgeldünnschicht ist ein stärker polarer, mit V/S

braungrün anfärbbarer Fleck zu beobachten, der nicht mehr im UV-Licht sichtbar ist.

R_f -Wert: 0,15 in EE (Phorbobutanon: 0,25).

Die Hälfte des harzartigen, nicht weiter gereinigten Trockenrückstandes aus dem Reduktionsansatz wird in 10 ml abs. Py mit 2,4 ml Benzoylchlorid versetzt, 23 Stdn. bei 4 °C belassen, nach Zusatz von 100 ml Wasser 6 Stdn. gerührt und nach Vorschrift a aufgearbeitet. Die Kieselgeldünnschicht zeigt keine einheitlich verlaufende Reaktion. Es werden zwei Produkte, **11** und **12** isoliert.

Aus dem Benzoylierungsansatz läßt sich das Produkt **11** mit kleinem R_f -Wert in 23% d. Th. (bezogen auf Phorbobutanon) erhalten. Das Harz wird zweimal aus $\text{PÄ}/\text{Diisopropyläther}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ umgefällt und liefert 59 mg dünnenschichtchromatographisch reine Substanz, die nicht kristallisierte.

R_f -Wert: 0,51 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 4/1$; Anfärbung mit V/S: grünbraun; $[\alpha]_{546}^{24} = -10^\circ$; $[\alpha]_{578}^{24} = 0^\circ$ (1%, Dioxan).

MS: Molekülion $m/e = 454$.

KMR (CDCl_3): H_2 (aromat.) 8,0; H_3 (aromat.) 7,55, 7,35; H^*7 5,50; H^*1 5,50; H_2 -20 4,71 (S); H_3 -3 4,15 (S); H_8 3,78 (DD; $J_{8,14} = 6$ cps, $J_{7,8}$ ca. 2 cps); H^*13 3,85; H_1 -11 2,10 (M); H^*14 , H_5 , H_9 , H_2 -12 ca. 2,80–2,30; H_3 -19 1,78 (M); H_3 -17 1,20 (S); H_3 -18 1,15 (D); $J_{11,18} = 7$ cps; H_3 -15 0,90 (S); OH (austauschbar) 3,0 (breit) ppm.

* Überlagert, ** teilweise überlagert.

IR (KBr): $\nu_{\text{O-H}}$ 3425, 3290; $\nu_{\text{C=O, Ester}}$ 1715; $\nu_{\text{C=C}}$ 1595, 1578 cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} 228, (266), 274, (279) nm; ϵ 14300, (1520), 1530, (1225).

Aus dem Benzoylierungs-Ansatz läßt sich das Produkt **12** mit größerem R_f -Wert isolieren. Die Säulenchromatographie an 250 g $\text{SiO}_2/13\%$ H_2O mit $\text{PÄ}/\text{Ä} = 1/1$ liefert 66 mg (11% d. Th. bezogen auf Phorbobutanon) Substanz, die in Nadeln vom Schmp. 190–193 °C aus $\text{PÄ}/\text{Diisopropyläther}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ kristallisiert.

R_f -Wert: 0,58 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{A} = 4/1$; Anfärbung mit V/S: grünbraun; $[\alpha]_{546}^{24} = -13^\circ$; $[\alpha]_{578}^{24} = -7^\circ$ (1%, Dioxan).

Von **12** konnte keine richtige Elementaranalyse und kein interpretierbares Massen-Spektrum erhalten werden.

KMR (CDCl_3): H_2 (aromat.) 8,0; H_3 (aromat.) 7,55–7,35; H^*7 5,68; H^*1 5,63; H_2 -20 4,71 (S); H_2 -12 4,48 (DD; $J_{11,12} = 3$ –4 cps; $J_{12,14} = 6$ –7 cps); H_3 -3 4,15 (S); H_8 3,88 (DD; $J_{7,8} = 5$ cps, $J_{8,14} = 12$ –13 cps); H^*14 2,63; H^*5 , H_9 ca. 2,8–2,5; H_1 -11 2,27 (M); $J_{11,18} = 7$ cps; $J_{11,12} = 3$ –4 cps; H_3 -19 1,75 (M); H_3 -18 1,30 (D; $J_{11,18} = 7$ cps); H_3 -17 1,30 (S); H_3 -16 1,20 (S); OH (austauschbar): 2,9 ppm.

* Überlagert.

IR (KBr): $\nu_{\text{O-H}}$ 3560, 3495; $\nu_{\text{C=O}}$ 1760, 1700; $\nu_{\text{C=C}}$ 1592 cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} 228, (268), 273, 281, (302); ϵ 14500, (966), 1060, 884, (113).

Für die Messung von Spektren sowie anregende Diskussionen danken wir den Herren Doz. Dr. A. MANN-SCHRECK, Dr. J. JOCHIMS, Heidelberg (KMR), Dr. CH. WÜNSCHE, Heidelberg, und Dr. W. SCHÄFER, München (MS), Doz. Dr. G. SNATZKE, Bonn, und Dr. V. SCHEIDEL, Heidelberg (CD).

Spectrophotometric Studies on Aggregation of Denatured DNA

S. BASU

Biophysics Laboratorien, Saha Institute of Nuclear Physics, Calcutta-37, India

(Z. Naturforsch. **24 b**, 106—109 [1969]; eingegangen am 18. Mai 1968)

Spectrophotometric studies have shown that aggregation of denatured DNA is dependent upon temperature (with an optimum at thirty seven degrees), concentration of the macromolecule, and on solvent conditions. The aggregates dissolve at very low (0 °C) and high temperatures (60 °C), and in very low concentrations of either macromolecule or salt in the solvent.

It is well known that some aggregation most likely takes place during any renaturation, this can be eliminated or reduced to a great extent by enzymes that digest denatured DNA specifically or by exposing renatured DNA to temperatures near the T_m or at very low temperatures in solvents of low ionic strength¹. It has been recently shown by MAY² that one can study the formation of aggregates of denatured DNA by rheological technique. Such treatment has been found not to provoke aggregation at either low ($T \cong 0.3$ °C) or high ($T \cong 70$ °C) temperatures, the most favourable temperature for aggregation being about 40 °C. According to this worker aggregates would continue to form in solution even at rest. Presumably such aggregation at constant temperature would proceed slowly even when the shearing stress is removed. The object of the present experiments is to study this phenomenon at various conditions with the help of spectrophotometry.

The results of denaturation at different temperatures have been presented in an earlier communication³. Optically, however, the effects of aggregation could hardly be distinguished from those of renaturation. So in most of the experiments presented here calf thymus DNA has been used. Results of other authors indicate that this DNA is less renaturable because of its less GC content^{1,4}. Some experiments have also been repeated with *E. coli* B DNA. The criteria for detecting aggregation is the fall in absorption at the two maxima of DNA absorption spectrum in the ultraviolet region, namely, one at 258 $m\mu$ (X) and the other at 204 $m\mu$ (Y)^{3,5,6}. Absorption studies at the 204 $m\mu$ peak have been made with special care for the effect due to stray light, salt absorption, instrumental cut-off and macromolecular scattering in this region. A detailed study concerning the above factors would be found in earlier papers by the present worker^{5,6}. A

¹ J. MARMUR, R. ROWND, and C. L. SCHILDKRAUT, in: "Progress in Nucleic Acid Research" (Ed. J. N. DAVIDSON and W. E. COHN) Vol. I, Academic Press, New York 1963, p. 231.

² P. MAY, J. molecular Biol. **9**, 263 [1964].

³ S. BASU, Z. Naturforsch. **23 b**, 561 [1968].

⁴ J. MARMUR and P. DOTY, J. molecular Biol. **3**, 585 [1961].

⁵ S. BASU, Biopolymers **5**, 876 [1967].

⁶ S. BASU and N. N. DAS GUPTA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **145**, 391 [1967].