

429. R. Tschesche und Hans A. Offe: Über Krötengifte, II. Mitteil.: Zur Kenntnis des Cino- und Marinobufagins.

[Aus d. Allgem. Chem. Universitäts-Laborat. in Göttingen.]

(Eingegangen am 21. September 1936.)

In unserer ersten Mitteilung¹⁾ über diesen Gegenstand berichteten wir, daß es uns gelungen war, aus dem Cinobufagin das typische Dehydrierungsprodukt der Verbindungen der Cholangruppe, das Methyl-cyclopentenophenanthren, zu erhalten. Dieser Befund wurde kurze Zeit später von Jensen²⁾ bestätigt. Wir sahen darin einen Hinweis, daß dem Cinobufagin das Kohlenstoffgerüst der Sterine und Gallensäuren zugrunde liegt. In dieser Arbeit teilen wir weitere Einzelheiten mit, die wir am Cinobufagin (aus *Bufo gargarizans*) und Marinobufagin (aus *Bufo marinus* oder *agua*) beobachtet haben.

Nach den Arbeiten von Kotake³⁾ und von Jensen⁴⁾ sollte das Cinobufagin die Zusammensetzung $C_{26}H_{32}O_6$ haben. Es wurde als ein zweifach ungesättigtes Lacton beschrieben, das eine sekundäre und eine tertiäre Hydroxylgruppe enthalten sollte, ferner einen Essigsäure-Rest an einer weiteren OH-Gruppe. Über die Natur der letzteren konnten bisher noch keine Aussagen gemacht werden. Im vorigen Jahr hat Crowfoot⁵⁾ an der Formel von Jensen auf Grund röntgenographischer Messungen Zweifel geäußert und eine Formel $C_{26}H_{34}O_6$ für wahrscheinlicher gehalten. Wir glauben, daß diese Ansicht richtig ist, da unsere Analysen nur mit der neuen Formulierung befriedigend in Einklang zu bringen sind⁶⁾. Demgemäß enthält das Cinobufagin nicht zwei, sondern drei Doppelbindungen, wie wir an einer Reihe von Hydrierungen sicher feststellen konnten. Eine quantitative Mikrohydrierung, ausgeführt von Rzeppa in Heidelberg, bestätigte unsere eigenen Ergebnisse. Merkwürdigerweise wurden unter den besonderen Bedingungen (großer Überschuß an Katalysator) noch vier weitere Mol. Wasserstoff, allerdings sehr viel langsamer, aufgenommen (vergl. die Kurve im Versuchsteil), die wohl aber nicht mehr der Absättigung von Doppelbindungen zugeschrieben werden können. Ein Derivat des Cinobufagins, die α -Desacetyl-hexahydro-cinobufaginsäure zeigte diese Erscheinung bei der Hydrierung nicht mehr. Auch für das Marinobufagin finden wir im Gegensatz zu Jensen eine Wasserstoff-Aufnahme von drei Mol., während dieser nur zwei beobachtet hat. Einen zusätzlichen Wasserstoffverbrauch haben wir beim Marinobufagin nicht beobachtet. Seine Formel $C_{24}H_{32}O_5$ läßt auch eher auf drei als auf zwei Doppelbindungen schließen.

Um über die Lage der Doppelbindungen Aufschluß zu erhalten, haben wir die Absorption des Cino- und Marinobufagins im Ultraviolett messen lassen⁷⁾. Wie sich aus den Kurven ergibt, liegt die Absorption bei 290—300 $m\mu$ ziemlich weit im langwelligen Teil des Ultraviolett-Spektrums. Ein solcher Befund ist aber nur mit der Konjugation zweier Kohlenstoff-Doppelbindungen mit der CO-Gruppierung der Lactongruppe zu erklären. Es muß also im Cino-

1) B. 68, 1998 [1935]. 2) H. Jensen, Journ. Amer. chem. Soc. 57, 2733 [1935].

3) M. Kotake, A. 465, 1 [1928].

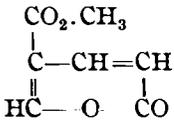
4) H. Jensen u. E. A. Evans, Journ. biol. Chem. 104, 307 [1934].

5) D. Crowfoot, C. 1935 II, 1190.

6) Hr. Dr. Jensen teilte dem einen von uns brieflich mit, daß er jetzt auch die Formel mit 26 C-Atomen für wahrscheinlicher hält.

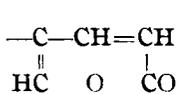
7) Die Messungen wurden von Hrn. Dr. Hagedorn durchgeführt.

und Marinobufagin in der Seitenkette ein zweifach ungesättigter Lactonring vorliegen, wahrscheinlich in der Art, wie ihn Stoll⁸⁾ für das Scillaren angenommen hat. Bemerkenswerterweise ähneln die Kurven der beiden Bufagine der des Scillarens weitgehend, wenn man die gemessenen Punkte auf den gleichen Maßstab umrechnet. Wir haben zum Vergleich auch die Absorption



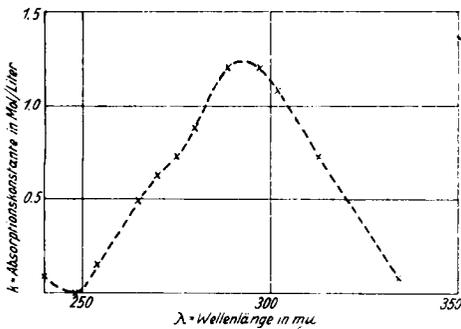
des Cumalinsäure-methylesters aufnehmen lassen, der ebenfalls ein Maximum bei 290—300 m μ aufweist. Als wir diese Arbeit zur Veröffentlichung fertig machten, erschien eine Arbeit von Wieland und Mitarb.⁹⁾, in der die Absorptionskurven des Bufotalins und seiner Nebengifte, des Gamabufagins und Arenobufagins mitgeteilt werden

und die gleichen Schlüsse bezüglich der Seitenkette dieser Krötengifte gezogen werden. Um diese Annahme für Cino- und Marinobufagin weiter zu stützen, haben wir in ihnen den Lactonring vorsichtig verseift. Wir konnten dabei ebenso wie Wieland¹⁰⁾ am Bufotalin und seinen Nebengiften die Entstehung einer freien oder latenten Aldehydgruppe nachweisen. Es tritt nach dem Ansäuern eine Rotfärbung von fuchsinschweflicher Säure auf, ferner eine Reaktion mit Eisenchlorid, beim Marinobufagin konnten wir letztere allerdings nicht beobachten. Cino- und Marinobufagin geben mit Alkali gelbe Lösungen, die beim Ansäuern wieder farblos werden. Die Einwirkung von Ozon führte auch beim Cinoobufagin zu Ameisensäure. Es scheint also den Bufaginen oder Bufogeninen,

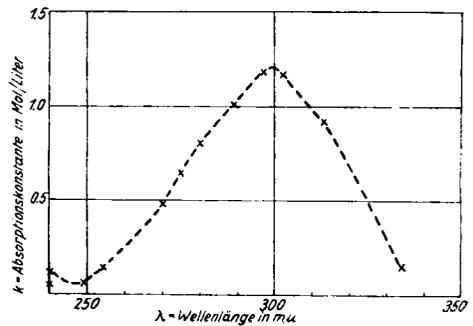


wie sie Wieland bezeichnet, allgemein der doppelt ungesättigte Lacton-Sechsring zugrunde zu liegen, wie er zuerst an dem pflanzlichen Herzgift Scillaren beobachtet wurde.

Die Hydrierung des Cinoobufagin-acetats lieferte uns zwei Hexahydroacetate α und β neben einer sehr kleinen Menge Säure, die durch hydrierende Aufspaltung des Lactonringes entstanden war. Beide Verbindungen sind isomer und unterscheiden sich wahrscheinlich nur in der sterischen Anordnung



Cinoobufagin.

k für 0.02 Proz. Lösung in CHCl₃.

Marinobufagin.

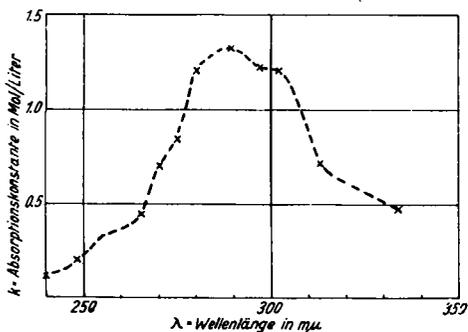
k für 0.02 Proz. Lösung in CHCl₃.

⁸⁾ A. Stoll u. Mitarb., *Helv. chim. Acta* **17**, 641, 1334 [1934]; **18**, 82, 161, 644, 1247 [1935].

⁹⁾ H. Wieland, G. Hesse u. E. Hüttel, *A.* **524**, 203 [1936].

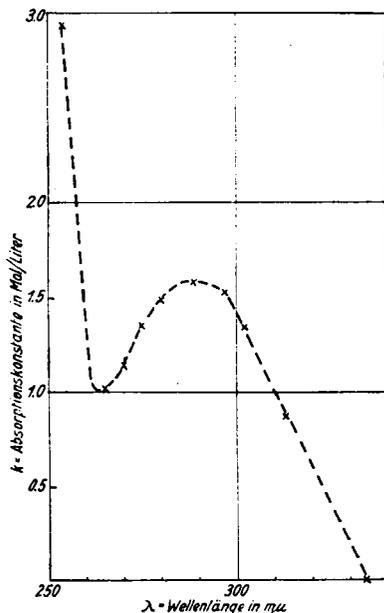
¹⁰⁾ H. Wieland u. G. Hesse, *A.* **517**, 22 [1935].

eines Wasserstoffatoms. Sie sind sicherlich mit den beiden perhydrierten Cinobufagin-acetaten von Kotake³⁾ identisch. Bei der Verseifung mit Alkali gehen sie unter Verlust der Acetylgruppen in zwei Säuren über, denen wahrscheinlich die Formel $C_{24}H_{38}O_5$ zukommt. Die Ermittlung der richtigen Zusammensetzung ist deswegen erschwert, weil die Säuren



Cinobufagin.

k für 0.02 proz. Lösung in Äther.



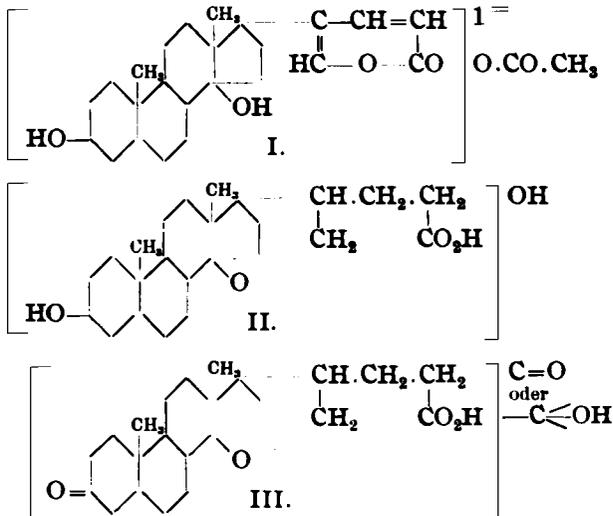
Cumalinsäure-methylester.

k für 0.02 proz. Lösung in Äther.

anscheinend mit Wasser krystallisieren, das beim Trocknen nicht völlig entfernt werden kann. Die Analysen stimmen nur dann auf die obige Formel, wenn man $1/2$ Mol. Krystallwasser annimmt. Die Verhältnisse liegen hier wohl ähnlich wie beim Cinobufagin selbst, dessen Analysen auch stets zu niedrige Kohlenstoffwerte liefern. Wenn die Annahme der Formel $C_{24}H_{38}O_5$ für die Säuren richtig ist, so muß ein Mol. Wasser bei ihrer Entstehung herausgespalten worden sein, denn eigentlich wäre eine Säure mit 6 O-Atomen zu erwarten gewesen. Eine Doppelbindung scheint aber nicht in ihnen vorhanden zu sein, da die α -Säure nicht katalytisch hydriert werden kann. Bei der vorsichtigen Oxydation der α -Säure mit Chromsäure-anhydrid wurde eine neue Säure erhalten, der anscheinend die Formel $C_{24}H_{34}O_5$ zukommt, doch möchten wir vorerst auch die Formel mit 36 H-Atomen nicht ganz ausschließen. Eine eingehendere Untersuchung der zuletzt erwähnten Säure war uns leider aus Materialmangel nicht möglich. Die Säure titriert sich in der Hitze einbasisch, es kann also in ihr nur die schon vor der Oxydation vorhandene Carboxylgruppe gebunden sein. Die Substanz bildet nur ein Monosemicarbazon, dürfte also nur eine Keto-Gruppe enthalten, wenn eine zweite nicht gerade an C_{11} des Cholangerüsts stehen sollte. Eine CO-Gruppe an dieser Stelle reagiert nicht oder nur sehr schwer mit Ketonreagenzien. Eine bemerkenswerte Absorption im Ultraviolett beobachteten wir an der Säure nicht.

Wir haben uns sehr um eine befriedigende Deutung dieser Befunde bemüht und sehen zur Zeit nur folgende Möglichkeit der Erklärung. Bei der Verseifung der Hexahydro-cinobufagin-acetate ist der Lactonring geöffnet worden. Die dabei freigewordene primäre Hydroxylgruppe hat mit einer anderen in Nachbarschaft befindlichen einen Ätherring gebildet. Die primäre

OH-Gruppe kann nach der Lactonring-Öffnung nicht erhalten geblieben sein, da sonst die Oxydation zu einer Dicarbonsäure oder Lactoncarbonsäure führen müßte. Die neue Säure enthält aber nur ebensoviel O-Atome wie die Ausgangssäure. Wir kommen so unter Zugrundelegung des Cholan-Kohlenstoff-Gerüsts zu den Formeln II und III für die Oxyssäure bzw. die Keto-säure. Immerhin bleibt die außerordentlich leichte Bildung eines Oxydringes auffällig. Die sekundäre Hydroxylgruppe haben wir in Analogie zu den anderen Verbindungen der gleichen Stoffklasse an C₃ verlegt, wie es Wieland auch für Bufotalin getan hat. Sie muß, wenn diese Annahme richtig ist, *trans*-Stellung zur Methylgruppe an C₁₀ haben, da Cinobufagin mit Digitonin keine schwerlösliche Additionsverbindung eingeht. Es kann dann auch von C₅ keine Doppelbindung ausgehen, da Cinobufagon nicht die Absorption eines α, β -ungesättigten Ketons zeigt. Die tertiäre OH-Gruppe wurde wie in den Geninen der pflanzlichen Herzgifte an C₁₄ verlegt, diese Stellung kann auch befriedigend die Bildung eines Oxydringes erklären. Doch ist natürlich auch möglich, daß die dritte nach der Verseifung des Essigsäure-Restes freigewordene OH-Gruppe für die Schließung des Oxydringes verbraucht wurde. Über die Lage der acetylierten Hydroxylgruppe können wir, ebenso wie über die dritte Doppelbindung noch keine Aussagen machen. Wir kommen so für Cinobufagin zu der vorläufigen Formel I, die natürlich weiterer Prüfung bedarf.



Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Roche-Fond) für die Überlassung eines Sachkredites, ferner Hrn. Dr. Chen von den Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Comp. vielmals für das uns zur Verfügung gestellte Ch'an Su.

Beschreibung der Versuche.

Cinobufagon.

200 mg Cinobufagin wurden in 4 ccm Eisessig gelöst und mit 0.3 ccm einer Mischung von 40 ccm Wasser, 8 g konz. Schwefelsäure und 3 g Chromsäure-anhydrid 10 Min. bei Zimmer-Temperatur stehengelassen. Nach dem

Eingießen in Wasser, Ausschütteln mit Chloroform und Abdampfen des Lösungsmittels kamen aus Methanol Krystalle, die nach mehrmaligem Umlösen den Schmp. 238⁰ zeigten.

2.804 mg Sbst.: 7.27 mg CO₂, 1.92 mg H₂O.

C₂₈H₃₂O₆. Ber. C 70.91, H 7.27. Gef. C 70.71, H 7.61.

Cinobufagin-monoacetat.

500 mg Cinobufagin wurden mit 3 ccm Essigsäure-anhydrid 3 Stdn. auf dem Wasserbade erwärmt. Nach Zersetzung des Essigsäure-anhydrids mit Wasser und Stehenlassen über Nacht wurde die bröckelig gewordene Masse abfiltriert, in Methanol gelöst und des öfteren daraus umgelöst. Schmp. 196⁰, nach sehr häufigem Umlösen aus Methanol feine glänzende Nadeln vom Schmp. 202⁰.

2.855 mg Sbst.: 7.25 mg CO₂, 1.89 mg H₂O.

C₂₈H₃₀O₇. Ber. C 69.42, H 7.43. Gef. C 69.26, H 7.40.

Bei der Aufarbeitung weiterer Mengen Ch'an Su wurde darauf verzichtet, das Cinobufagin als solches zu isolieren. Es erwies sich als zweckmäßiger, die nach der Adsorption¹⁾ gewonnenen Lösungen nach dem Abdampfen des Lösungsmittels in entsprechender Weise unter Zusatz von Natriumacetat zu acetylieren. Die Aufarbeitung geschah wie bei der Acetylierung des reinen Cinobufagins. Die Krystallisation ließ sich durch Aufkochen der Lösung mit Tierkohle erleichtern.

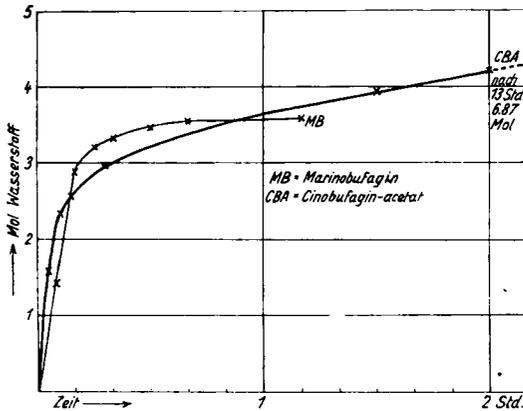
Aus den Mutterlaugen konnte nach sehr häufigem Umlösen ein Stoff vom Schmp. 226⁰ gewonnen werden, der mit dem Desacetyl-anhydrobufalin von Kotake¹⁾ identisch ist. Bei der Acetylierung des reinen Cinobufagins war dieser Stoff im Reaktionsprodukt nicht zu finden.

α- und β-Hexahydro-cinobufagin-monoacetat.

500 mg Cinobufagin-acetat wurden mit 200 mg Platinoxid in Eisessig 6 Stdn. in Wasserstoff-Atmosphäre geschüttelt. Dabei wurden 75 ccm (entsprechend etwa 3 Mol.) aufgenommen.

Das Reaktionsprodukt wurde im Vakuum vom Eisessig befreit, in Chloroform aufgenommen und mit Natriumcarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Es konnten nach dem Ansäuern der Carbonat-Lösung etwa 1% saure Anteile gewonnen werden. Diese ergaben durch häufiges Umlösen aus Aceton Krystalle vom Schmp. 190⁰. Zur Analyse reichte das Material nicht aus.

Der Neutralteil krystallisierte nach dem Entfernen des Chloroforms beim Anspritzen mit Methanol bald. Durch wiederholtes Umlösen aus viel Methanol wurden etwa 30% (bezogen auf Ausgangsmaterial) krystallisiertes Hydroprodukt erhalten. Es war dies ein Gemisch von Isomeren, deren eines, α-Hexahydro-cinobufagin-monoacetat (Schmp. 238⁰, Nadeln aus Methanol), in etwa 90% des krystallisierten Anteils anfiel, während das andere, β-Hexahydro-cinobufagin-monoacetat (Schmp. 250⁰ unt. Zers., 3-seitige Prismen), aus den methanolischen Mutterlaugen der α-Komponente durch Umlösen aus Essigester gewonnen wurde. Die restlichen 70% des Neutralteils blieben ein gelbliches Öl, aus dem sich weder durch Umlösen aus den verschiedensten Lösungsmitteln, noch durch Adsorption in Benzol-Chloroform-



Mikrohydrierung des Cinobufagin-acetats und des Marinobufagins mit PtO_2 -Katalysator in Eisessig.

Gemisch an Aluminiumoxyd (nach Brockmann) weitere kristallisierte Anteile gewinnen ließen.

Dieses Verhältnis von Krystallen zu Öl wurde auch nicht wesentlich geändert, als in Äthanol mit Palladium-Mohr, mit Platin-Mohr, in Eisessig mit Platinoxid unter HCl -Zusatz und in Eisessig mit Platinoxid unter 150 Atm. Druck hydriert wurde.

α -Hexahydro-cinobufagin-monoacetat: 2.802 mg
Sbst.: 7.05 mg CO_2 , 2.12 mg H_2O .
 $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_7$. Ber. C 68.57, H 8.57.
Gef. „ 68.62, „ 8.46.

α -Desacetyl-hexahydro-cinobufagin-säure.

1 g α -Hexahydro-cinobufagin-monoacetat vom Schmp. 238° wurde mit 30 ccm 5-proz. methanolischer Kalilauge 1 Stde. unter Rückfluß auf dem Wasserbade erwärmt. Das Reaktionsprodukt wurde zur Abtrennung neutraler Anteile in Wasser gegossen und mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Ansäuern der Lösung wurde die frei gemachte Säure mit Chloroform aufgenommen. Der Rückstand nach dem Abdampfen des Lösungsmittels ergab aus wenig Aceton Krystalle, die nach mehrmaligem Umlösen aus Aceton-Äther in Form von feinen Nadeln vom Schmp. 160° (unscharf) erhalten wurden. Ausbeute 0.5 g.

2.765 mg Sbst.: 7.04 mg CO_2 , 2.21 mg H_2O .

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_5 + \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$. Ber. C 69.40, H 9.39. Gef. C 69.44, H 8.94.

Bei der katalytischen Hydrierung nimmt die Säure keinen Wasserstoff auf; sie gibt mit Tetranitromethan keine Färbung. Sie läßt sich aus Chloroform-Lösung mit Soda ausziehen und färbt blaues Lackmuspapier rot.

β -Desacetyl-hexahydro-cinobufagin-säure.

300 mg β -Hexahydro-cinobufagin-monoacetat vom Schmp. 250° unt. Zers. wurden mit 10 ccm 5-proz. methanolischer Kalilauge 1 Stde. auf dem Wasserbade erwärmt. Die Aufarbeitung wurde in der gleichen Weise wie bei der α -Säure durchgeführt. Dreiseitige Prismen vom unscharfen Schmp. 180° aus Aceton und aus Essigester.

2.844 mg Sbst.: 7.22 mg CO_2 , 2.31 mg H_2O .

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_5 + \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$. Ber. C 69.40, H 9.39. Gef. C 69.24, H 9.08.

Desacetyl-hexahydro-cinobufagin-säure.

500 mg α -Desacetyl-hexahydro-cinobufagin-säure wurden mit Chromsäure-anhydrid in Eisessig 1 Stde. bei 0° stehengelassen. Die Lösung wurde in Wasser gegossen und mit Chloroform und Äther ausgeschüttelt. Der

Abdampfrückstand krystallisierte nicht. Er wurde darauf in Benzol-Chloroform-Lösung durch eine Säule mit Aluminiumoxyd filtriert und die ablaufende Lösung von 5 zu 5 ccm aufgefangen. Die mittleren Fraktionen lieferten nach dem Eindampfen nach Anspritzen mit Aceton Krystalle, die durch Umlösen aus wäßr. Aceton gereinigt wurden. Es wurden zu Büscheln vereinigte Nadeln vom Schmp. 205° erhalten.

2.833 mg Sbst.: 7.49 mg CO₂, 2.23 mg H₂O. — 6.582 mg Sbst. verbraucht. 1.74 ccm n/100-NaOH.

C₂₄H₃₄O₅. Ber. C 71.64, H 8.45, Äquiv.-Gew. 402.

Gef. „ 72.10, „ 8.81, „ 365*).

*) Eine nochmalige Analyse der Säure war uns leider aus Materialmangel nicht mehr möglich.

Das Semicarbazon wurde aus 16 mg der Ketosäure in der üblichen Weise bereitet. Es krystallisierte aus wäßr. Äthanol in Nadeln vom Zers.-Pkt. 217°.

3.208 mg Sbst.: 0.265 ccm N (21°, 746 mm).

C₁₈H₂₇O₅N₃. Ber. N 9.15. Gef. N 9.41.

Nachweis der Aldo-Enol-Struktur des Lactonringes im Cinobufagin und Marinobufagin.

100 mg Cinobufagin, in 100 ccm aldehydfreiem Methanol gelöst, wurden mit 0.8 ccm einer n/1-methanolischen Bariumhydroxyd-Lösung versetzt und 2 Min. auf dem Wasserbade erwärmt. Die Lösung färbte sich alsbald grünlichgelb. Nach Zusatz eines Tropfens fuchsinschwefliger Säure trat sofort starke Rotfärbung auf. In einem anderen Anteil wurde nach dem Versetzen mit verd. methanolischer Salzsäure bis zur eben sauren Reaktion gegen Lackmus (Verschwinden der Gelbfärbung) mit wäßr. Eisenchlorid-Lösung die Enol-Struktur nachgewiesen (Tiefbraunfärbung).

Das benutzte Methanol war durch 36-stdg. Stehenlassen über Dimedon vom Aldehyd befreit worden und gab keine Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure mehr.

Beim Marinobufagin wurde unter denselben Bedingungen wohl eine Färbung der fuchsinschwefligen Säure nachgewiesen, dagegen trat mit Eisenchlorid keine Farbreaktion auf. Die alkalische Lösung war auch hier gelb gefärbt.

Ozonisation des Cinobufagins.

250 mg Cinobufagin wurden unter Eiskühlung 1½ Stdn. in Chloroform-Lösung mit Ozon behandelt. Nach dem Abdampfen des Chloroforms im Vakuum bei Zimmertemperatur wurde das entstandene Ozonid mit Wasserdampf zerlegt. Die flüchtigen Reaktionsanteile wurden dabei in einer mit eisgekühltem Wasser beschickten Vorlage aufgefangen. Die Lösung reagierte sauer, reduzierte ammoniakalische Silberlösung und gab mit Dimedon keinen schwer löslichen Niederschlag. Es dürfte Ameisensäure vorgelegen haben.