

210. Über herzkaktive Krötengifte (Bufogenine).

3. Mitteilung¹⁾.

Konstitution des Telocinobufagins

von Kuno Meyer.

(19. VI. 49.)

Bei der Aufarbeitung eines Chloroformextraktes aus Ch'an Su war in kleiner Menge ein Bufogenin der Formel $C_{24}H_{34}O_5$ isoliert worden, das mit keinem der bisher bekannten Bufogenine identisch war. Da sich dieses neue Bufogenin bei der Chromatographie an Al_2O_3 viel später als die andern Bufogenine aus Ch'an Su von der Säule ablösen liess, wurde es als Telocinobufagin bezeichnet²⁾).

Telocinobufagin unterscheidet sich von Bufalin, dessen Abbau mit $KMnO_4$ eindeutig gezeigt hatte¹⁾, dass dieses Bufogenin bis auf die Natur des Lactonringes genau gleich gebaut ist wie Digitoxigenin, durch den Mehrgehalt einer HO-Gruppe. Da Telocinobufagin bei der Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin wie Bufalin selbst nur eine Monoacetylverbindung liefert, war anzunehmen, dass es sich bei der zusätzlichen HO-Gruppe um eine tertiäre oder eine unter den üblichen Bedingungen nicht acetylierbare sekundäre HO-Gruppe (z. B. 11β) handeln könnte. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten brachte die Dehydrierung von Telocinobufagin mit CrO_3 in Eisessig. Dabei entstand ein Monoketon der Formel $C_{24}H_{32}O_5$, das nach kurzem Erwärmen in Eisessig^{b)} unter Verlust von 1 Mol. H_2O in einen Stoff $C_{24}H_{30}O_4$ überging. Dieser zeigte in alkoholischer Lösung im Ultraviolett selektive Absorption mit 2 Maxima, eines bei $300 m\mu$ und $\log \epsilon = 3,72$, das andere bei $240 m\mu$ und $\log \epsilon = 4,23$ (siehe Kurve). Ersteres entspricht dem $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -doppeltungesättigten Lactonring und das zweite einem α, β -ungesättigten Keton.

Demnach muss Telocinobufagin eine sekundäre und zwei tertiäre HO-Gruppen enthalten, und die Eigenschaften des Ketons (Telocinobufagon), unter so milden Bedingungen Wasser abzuspalten, wobei ein α, β -ungesättigtes Keton entsteht, sprechen dafür, dass die eine tertiäre HO-Gruppe zur sekundären in β -Stellung steht. Auf Grund dieser Ergebnisse und in Analogie zum Bufalin könnte dem Telocinobufagin somit die Formel V zukommen. Dank günstiger Umstände konnte diese Annahme auf anderem Wege eindeutig bewiesen werden.

¹⁾ 2. Mitt., K. Meyer, Helv. 32, 1238 (1949).

²⁾ Die mit Buchstaben bezeichneten Fussnoten siehe Formelseite.

Bei der Isolierung des Telocinobufagins^{d)} aus Ch'an Su waren recht beträchtliche Mengen amorpher Mutterlaugen erhalten worden. Aus diesen konnte jetzt nach Acetylierung und erneuter Chromatographie neben andern noch nicht untersuchten Fraktionen, die möglicherweise noch ein oder zwei weitere Bufogenine als Acetylverbindungen enthalten, 290 mg reines Telocinobufagin-acetat (VI) gewonnen werden. Dieses Material wurde mit KMnO_4 in Aceton nach der Methode von Steiger und Reichstein¹⁾ abgebaut. Die Aufarbeitung des Oxydationsproduktes lieferte wie im Falle des Bufalin-acetates²⁾ saure und neutrale Anteile.

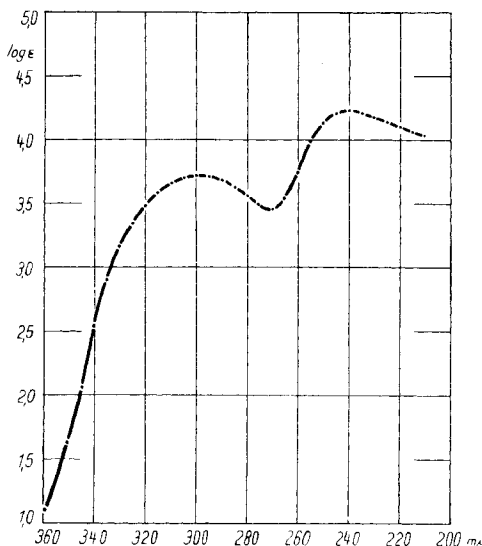


Fig. 1.

Anhydro-telocinobufagon (IX) in Alkohol.

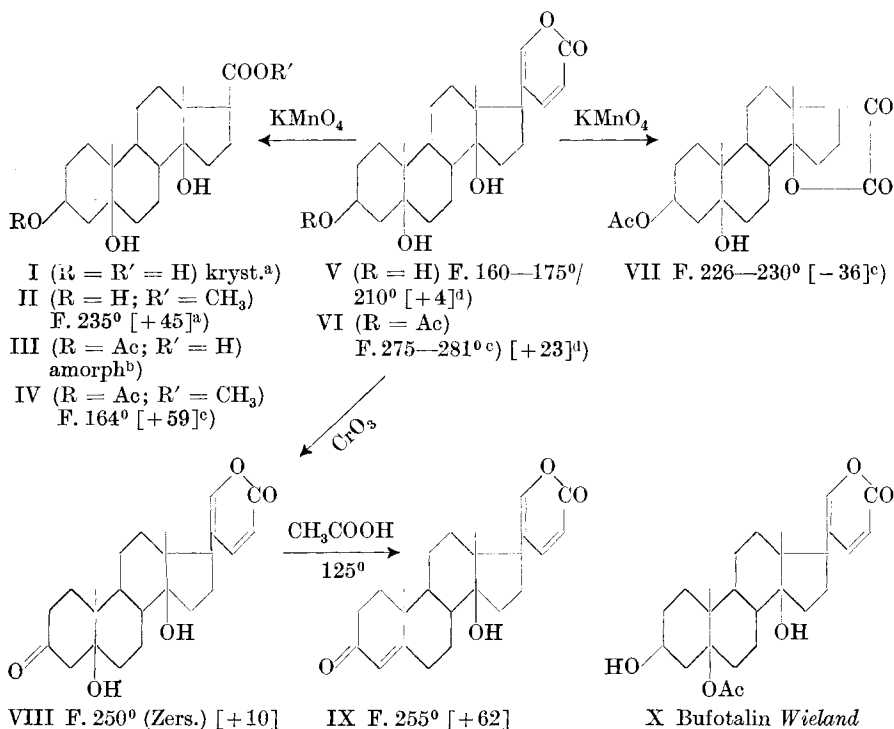
Da die Säure nicht kristallisierte, wurde sie methyliert und chromatographisch gereinigt. Auf diese Weise liessen sich flache, zu Drusen vereinigte Prismen gewinnen, die bei $162\text{--}165^\circ$ schmolzen, mit 3β -Acetoxy-5,14-dioxy-14-*iso*-ätiocholansäure-methylester (IV) aus Periplogenin^{b)}^{a)} vom Smp. $164\text{--}166^\circ$ ³⁾ keine Depression gaben und sich auch bezüglich der spez. Drehung, Analyse und Farbreaktion mit konz. H_2SO_4 als völlig identisch mit dem Ester IV aus Periplogenin erwiesen. Der Neutralteil des KMnO_4 -Abbaus lieferte 3β -Acetoxy-5,14-dioxy-20-keto-14-*iso*-pregnan-21-säure-Lacton-(21 \rightarrow 14) (VII),

¹⁾ M. Steiger und T. Reichstein, Helv. **21**, 828 (1938).

²⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1238 (1949).

³⁾ P. Speiser und T. Reichstein fanden für diesen Ester den Smp. $159\text{--}161^\circ$ ^{b)} bzw. $158\text{--}163^\circ$ ^{a)}. Durch chromatographische Reinigung eines Vergleichspräparates vom Smp. $158\text{--}163^\circ$ liess sich der Smp. auf $164\text{--}166^\circ$ erhöhen.

das erstmals aus Periplogenin erhalten worden war. *Speiser* und *Reichstein*^{a)} fanden für VII eine spez. Drehung von $[\alpha]_D^{18} = -56,0^\circ$ (in Chloroform) und den Smp. 220—223°. Das Lacton VII aus Telocinobufagin-acetat (VI) zeigte aber $[\alpha]_D^{18} = -36,1^\circ$ (in Chloroform) und schmolz bei 226—230°. Nach zweimaligem Umkrystallisieren des Ketolactons von *Speiser* und *Reichstein* stieg der Schmelzpunkt auf 226—230° und das Präparat zeigte bei der Mischprobe mit obigem Ketolacton keine Depression. Eine erneute Bestimmung der spez. Drehung des Ketolactons von *Speiser* und *Reichstein* ergab nun aber den Wert $[\alpha]_D^{18} = -35,8^\circ$ (in Chloroform)¹⁾. Da ausserdem beide Keto-



Ac = CH₃CO—. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Grade auf- oder abgerundete spez. Drehung für Na-Licht in Chloroform an.

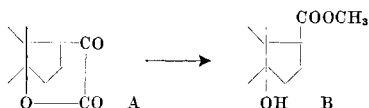
a) *P. Speiser* und *T. Reichstein*, *Helv.* **31**, 622 (1948).

b) *P. Speiser* und *T. Reichstein*, *Helv.* **30**, 2143 (1947).

c) Vgl. exper. Teil dieser Arbeit.

d) *K. Meyer*, *Pharm. acta Helv.* **24** (1949), im Druck.

¹⁾ Dieser Wert stimmt mit früheren Beobachtungen gut überein, denn beim Übergang von A nach B wird durchschnittlich eine Verschiebung der spez. Drehung von +90° beobachtet. Vgl. *F. Hunziker* und *T. Reichstein*, *Helv.* **28**, 1472 (1945) und *A. Buzas* und *T. Reichstein*, *Helv.* **31**, 84 (1948).



lactone mit konz. H_2SO_4 die nämliche charakteristische und intensive Farbreaktion zeigten, ist an der Identität des Ketolactons aus Periplogenin mit dem hier aus VI erhaltenen nicht zu zweifeln.

Diese Abbauresultate zeigen einwandfrei, dass Telocinobufagin die Strukturformel V besitzt und bis auf die Natur des Lactonringes auch räumlich genau gleich gebaut ist wie Periplogenin.

Dem ungesättigten Keton IX kommt für die Frage der Konstitution von Bufotalin eine gewisse Bedeutung zu. *Wieland* und Mitarbeiter haben auf Grund eingehender Untersuchungen für dieses Bufogenin im Jahre 1941 die Formel X vorgeschlagen¹⁾. Bufotalin würde sich damit vom Telocinobufagin nur dadurch unterscheiden, dass die tertiäre HO-Gruppe an C_5 acetyliert ist. Eine Reihe von Abbauresultaten, die *Wieland* und seine Schule gewinnen konnten, sind mit diesem Formelvorschlag durchaus verträglich. „Ein leichter Schatten liegt noch über dieser Formel“ schreiben *Wieland* und *Behringer*, denn das aus dem Keton Bufotalon leicht erhältliche Bufotalienon sollte — abgesehen von einer zusätzlichen Doppelbindung an C_{14} — dem ungesättigten Keton IX der vorliegenden Arbeit entsprechen und somit im Ultraviolett die nämlichen charakteristischen Maxima wie dieses aufweisen. *Wieland's* Bufotalienon zeigt aber nur das für den doppelt ungesättigten Lactonring typische Maximum bei $300\ m\mu$. Diese Diskrepanz versuchten *Wieland* und *Behringer* damit zu erklären, dass möglicherweise das für die α,β -ungesättigte Keton-gruppierung typische Maximum durch das sehr ausgesprochene von $300\ m\mu$ nicht in Erscheinung treten kann oder dass infolge der stark ungesättigten Natur des Bufotalienons die Doppelbindung sich nicht wie üblich von C_4 nach C_5 , sondern von C_5 nach C_6 ausbildet.

Die leichte Bildungsweise von IX aus VIII und das typische Spektrum von IX mit den erwarteten beiden Maxima ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass sich *Wieland* in seinen Schlussfolgerungen bezüglich der Entstehungsweise und der Konstitution des Bufotalienons getäuscht hat. Damit wird auch die vorgeschlagene Formel für Bufotalin hinfällig, wenigstens in bezug auf die Haftstelle und gegenseitige Lage der beiden HO-Gruppen an den Ringen A und B im Sterinskelett²⁾.

Der „Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie“ danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit und Herrn Prof. *T. Reichstein* für sein Interesse an diesen Untersuchungen.

Experimenteller Teil.

Alle Schmelzpunkte sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze bis 200° ca. $\pm 2^{\circ}$, darüber ca. $\pm 3^{\circ}$. „Schweinchén“ bedeutet, dass die unmittelbar vor der Verbrennung getrocknete Substanz im Schweinchén eingewogen wurde.

¹⁾ *H. Wieland* und *H. Behringer*, *A.* **549**, 209 (1941).

²⁾ Vgl. auch die diesbezügliche Diskussion von *L. F. Fieser* und *M. Fieser* in „Natural Products Related to Phenanthrene“, 3rd ed., p. 565 ff. (*Reinhold* Pub. Corp., New York, 1949).

Telocinobufagon (VIII) aus V.

20 mg Telocinobufagin (V) vom Smp. 160—175^o/210—211^o und 25 mg kryst. Mutterlauge wurden in 2 cm³ Eisessig gelöst und mit 0,5 cm³ 2-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung versetzt und bei 18^o stehengelassen. Nach 2 Stunden wurde in stündlichen Intervallen noch dreimal je 0,1 cm³ 2-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung zugegeben. Nach weiteren 4 Stunden war CrO₃ noch deutlich nachweisbar. Hierauf wurde mit einigen Tropfen Methanol versetzt und 15 Stunden bei 18^o stehengelassen. Eindampfen im Vakuum bei ca. 30^o, Aufnehmen in Chloroform-Äther, Waschen mit verdünnter H₂SO₄ (bis diese farblos blieb), verdünnte Na₂CO₃-Lösung und Wasser, Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen gab ca. 40 mg Rückstand. Dieser wurde an 1,2 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Benzol-Chloroform (9:1) und (4:1) eluierten Anteile (34 mg), gaben nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Aceton-Äther 14 mg flache Nadeln vom Smp. 250—252^o (leichte Zers. und Gelbfärbung); $[\alpha]_D^{17} = +10,4^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,1488$ in Chloroform) (Trocknung 1 Stunde im Hochvakuum bei 100^o).

11,505 mg Substanz zu 1,0015 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{17} = +0,12^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$.

Zur Analyse wurde 10 Stunden im Hochvakuum bei 60^o über P₂O₅ getrocknet (Schweinchen).

3,247 mg Subst. gaben 8,563 mg CO₂ und 2,376 mg H₂O (OAB)

C₂₄H₃₂O₅ (400,50) Ber. C 71,97 H 8,06% Gef. C 71,99 H 8,19%

Anhydro-telocinobufagon (IX) aus VIII.

7 mg VIII vom Smp. 250—252^o (Zers.) und 20 mg krystallisierte Mutterlauge wurden in 0,5 cm³ Eisessig gelöst und 10 Minuten auf 125^o (Badtemperatur) erhitzt. Nach Abdampfen des Eisessigs im Vakuum wurde der Rückstand in Chloroform-Äther neutral gewaschen und hierauf an 700 mg Al₂O₃ chromatographiert. Benzol, Benzol-Chloroform (9:1) und (4:1) eluierten 12 mg Material, das aus Aceton in kleinen Prismen vom Smp. 230—250^o (Zers. und Gelbfärbung) krystallisierte. Die Krystalle wurden im Hochvakuum bei 180—200^o sublimiert und das Sublimat aus Aceton umkrystallisiert. Ausbeute ca. 6 mg. Smp. 255—258^o (Gelbfärbung und Sint. ab 248^o); $[\alpha]_D^{17} = +62,0^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 0,5003$ in Chloroform) (Trocknung 1 Stunde im Hochvakuum bei 100^o).

5,010 mg Subst. zu 1,0015 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{17} = +0,31^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$

Zur Analyse wurde 2 Stunden im Hochvakuum bei 100^o über P₂O₅ getrocknet.

4,060 mg Subst. gaben 11,250 mg CO₂ und 2,971 mg H₂O (OAB)

C₂₄H₃₀O₄ (382,48) Ber. C 75,36 H 7,91% Gef. C 75,61 H 8,19%

Das UV.-Absorptionsspektrum ist im theoretischen Teil wiedergegeben.

Telocinobufagin-acetat (VI).

Bei der Isolierung des Telocinobufagins (V) aus den Chromatographiefraktionen (Chloroform) waren reichliche Mengen amorpher Mutterlaugen erhalten worden^d). Diese wurden wie üblich in Pyridin mit Acetanhydrid acetyliert und das rohe Acetatgemisch (2,8 g) an 90 g Al₂O₃ nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Die mit Benzol, Benzol-Chloroform (19:1) und (9:1) gewonnenen Fraktionen (total ca. 950 mg) waren uneinheitlich und schmolzen alle bei ca. 165—195^o. Sie wurden bis jetzt nicht näher untersucht. Benzol-Chloroform (4:1), (1:1) und (1:3) eluierten 1,07 g Material, aus dem sich 290 mg Telocinobufagin-acetat (VI)^d) vom Smp. 275—281^o (Sint. ab 265^o) gewinnen liessen.

3β-Acetoxy-5,14-dioxy-14-iso-ätiocolansäure-methylester (IV) aus VI.

250 mg VI vom Smp. 275—281^o (Sint. ab 265^o) wurden durch Erwärmen in 70 cm³ Aceton gelöst, nach dem Abkühlen mit 300 mg fein gepulvertem KMnO₄ versetzt und

2 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Hierauf wurde in Intervallen von je 2 Stunden nach zweimal 50 mg KMnO_4 zugegeben. Nach total 6 Stunden zeigte die Tüpfelprobe noch sehr wenig unverbrauchtes KMnO_4 . Die Aufarbeitung geschah wie früher¹⁾ und lieferte 160 mg saure und 60 mg neutrale Anteile.

Die sauren Anteile liessen sich nicht zur Krystallisation bringen. Sie wurden mit ätherischer Diazomethanlösung methyliert und der Methyl ester chromatographiert. Die mit Benzol, Benzol-Chloroform (19:1), (9:1) und (4:1) eluierten Anteile (total ca. 100 mg) gaben nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Äther-Petroläther 65 mg flache, zu Drusen vereinigte Prismen, Smp. 162—165°; $[\alpha]_D^{18} = +58,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1613$ in Chloroform)²⁾ (Trocknung 1 Stunde im Hochvakuum bei 100°).

21,645 mg Subst. zu 1,0015 cm^3 ; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{18} = +1,27^\circ \pm 0,02^\circ$

Die Mischprobe mit 3 β -Acetoxy-5,14-dioxy-14-*iso*-ätiolcholsäure-methylester (IV) aus Periplogenin^{b, a)} vom Smp. 164—166° (siehe unten) schmolz bei 163—166°.

Zur Analyse wurde 4 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet (Schweinchen).

3,562 mg Subst. gaben 8,813 mg CO_2 und 2,821 mg H_2O (ETH.)

$\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_6$ (408,52) Ber. C 67,62 H 8,88% Gef. C 67,52 H 8,86%

Die Färbungen beider Ester mit konz. H_2SO_4 waren genau gleich: orange \rightarrow orangebraun (1 Stunde) \rightarrow braun (2 Stunden) \rightarrow blau (4 Stunden) \rightarrow grünblau (5 Stunden) \rightarrow blaugrün (6 Stunden) \rightarrow grün (8 Stunden).

3 β -Acetoxy-5,14-dioxy-20-keto-14-*iso*-pregnan-21-säure-Lacton-
(21 \rightarrow 14) (VII).

Die 60 mg neutrale Anteile des Abbauproduktes (siehe oben) gaben aus Aceton-Äther feine Nadelchen, die nach erneutem Umlösen aus demselben Lösungsmittel bei 226—230° schmolzen; $[\alpha]_D^{18} = -36,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0529$ in Chloroform) (Trocknung 1 Stunde bei 100° im Hochvakuum).

10,545 mg Subst. zu 1,0015 cm^3 ; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{18} = -0,38^\circ \pm 0,02^\circ$

Zweimaliges Umkrystallisieren des Vergleichspräparates VII von Speiser und Reichstein^{a)} gab dieselben Nadelchen. Smp. 226—230°. Mischprobe ebenso. $[\alpha]_D^{18} = -35,85^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,6136$ in Chloroform) (Trocknung wie oben).

6,145 mg Subst. zu 1,0015 cm^3 ; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{18} = -0,22^\circ \pm 0,02^\circ$

Zur Analyse wurde 3 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet (Schweinchen).

2,970 mg Subst. gaben 7,399 mg CO_2 und 2,235 mg H_2O (ETH.)

$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (404,49) Ber. C 68,29 H 7,97% Gef. C 67,99 H 8,43%

Die Färbungen beider Ketolactone mit konz. H_2SO_4 waren genau gleich: orange \rightarrow tiefviolett (5 Sekunden, 8 Stunden).

Reinigung des 3 β -Acetoxy-5,14-dioxy-14-*iso*-ätiolcholsäure-methylesters
(IV) aus Periplogenin-acetat^{b, a)}.

150 mg eines Präparates von IV aus Periplogenin-acetat, Smp. 158—163°, wurden an 4,5 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Benzol und Benzol-Chloroform (19:1 und 9:1) eluierbaren Anteile (total 80 mg) gaben nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Äther-Petroläther 60 mg flache, zu Drusen vereinigte Prismen vom Smp. 164—166°. Aus den mit Benzol-Chloroform (4:1) und (1:1) eluierten Anteilen (ca. 60 mg) wurden aus Äther feine, farblose Nadelchen erhalten, die bei 205—235° schmolzen. Dieses Nebenprodukt wurde nicht näher untersucht.

¹⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1238 (1949).

²⁾ Vgl. Anm. 3, S. 1594, dieser Arbeit.

Die Mikroanalysen wurden teils im mikroanalytischen Laboratorium der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel (Leitung *E. Thommen*) (OAB), teils im mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich (Leitung *W. Manser*) (ETH.) ausgeführt. Das UV.-Absorptionsspektrum hat Herr cand. chem. *P. Zoller* aufgenommen.

Zusammenfassung.

Durch Abbau von Telocinobufagin-acetat mit KMnO_4 in Aceton wurde 3β -Acetoxy-5,14-dioxy-14-*iso*-ätiocholansäure und 3β -Acetoxy-5,14-dioxy-20-keto-14-*iso*-pregnan-21-säure-Lacton-(21 \rightarrow 14) erhalten. Damit ist die Konstitution und Konfiguration des Telocinobufagins bewiesen und gezeigt, dass dieses neue Bufogenin bis auf die Natur des Lactonringes auch räumlich genau gleich gebaut ist wie Periplogenin.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

211. Über herzaktive Krötengifte (Bufogenine)

4. Mitteilung¹⁾.

Konstitution des Gamabufotalins

von **Kuno Meyer**.

(19. VI. 49.)

Im Jahre 1928 isolierte *Kotake*²⁾ aus den Häuten der japanischen Kröte (*Bufo vulgaris formosus*³⁾) in beträchtlicher Menge⁴⁾ ein noch unbekanntes Bufogenin, das er Gamabufotalin⁵⁾ nannte. Das nämliche Bufogenin wurde kurze Zeit später auch von *Wieland* und *Vocke*^{d)} aus gleichem Material gewonnen und von diesen Autoren als Gamabufogenin bezeichnet. Die Identität wurde durch direkten Vergleich mehrerer Derivate gut gesichert⁶⁾. *Chen* und Mitarbeiter^{e)} isolierten aus dem Parotissekret der japanischen Kröte ein Bufogenin,

¹⁾ 3. Mitt., *K. Meyer*, *Helv.* **32**, 1593 (1949).

²⁾ Die mit Buchstaben bezeichneten Fussnoten a–f siehe Seite 1601.

³⁾ *Kotake* hatte zuerst^{e)} die Krötenspezies mit *Bufo bufo japonicus* angegeben. Eine später⁷⁾ durchgeführte exakte zoologische Bestimmung ergab aber, dass es sich um die oben aufgeführte Spezies gehandelt hatte. Nach *O. Gessner*, „Tierische Gifte“ in *Heffter's* Handbuch d. exptl. Pharmakologie, Erg.-Werk, Band VI, p. 38ff. (*J. Springer*, Berlin 1938), wird die von *Kotake* untersuchte Kröte als *Bufo formosus* Boulenger = *Bufo bufo formosus* *Kotake* = *Bufo bufo japonicus* = japanische Erdkröte bezeichnet.

⁴⁾ Aus 5000 Häuten wurden 35 g reines Gamabufotalin gewonnen.

⁵⁾ Abgeleitet vom japanischen Wort „gama“ = Kröte und nicht vom griechischen Buchstaben γ = Gamma, wie manchmal irrtümlich angenommen wird.

⁶⁾ *M. Kotake*, *Scient. Pap. Inst. Physic. Chem. Res. (Tokyo)* **24**, 39 (1934); *C.* **1934**, II, 459.

⁷⁾ *M. Kotake*, *Scient. Pap. Inst. Physic. Chem. Res. (Tokyo)* **9**, 233 (1928); *C.* **1929**, I, 916.