

152. Zur Konstitution des Marinobufagins, III. Mitteilung¹⁾

Über Krötengifte, 18. Mitteilung²⁾

von **Herbert Schröter**, **Richard Rees** und **Kuno Meyer**

(28. V. 59)

In der letzten Mitteilung über Marinobufagin war gezeigt¹⁾ worden, dass diesem die Bruttoformel $C_{24}H_{32}O_5$ zukommen muss. Ferner war auf Grund der Ergebnisse von Abbauprobungen für dieses Bufogenin die Formel eines 3 β , 5-Dihydroxy-oxido-5 β -bufa-20,22-dienolids in Vorschlag gebracht worden, wobei dessen Steroidnatur durch das Resultat der Selendehydrierung³⁾ als erwiesen angesehen wurde. Genauere chemische Anhaltspunkte über die Art und die Haftstelle der vermuteten Oxidogruppe konnten damals aber nicht erzielt werden. Inzwischen haben REICHSTEIN und Mitarb.⁴⁾ auf spektroskopischem Wege einen zuverlässigen Hinweis für das Vorliegen einer Epoxydgruppe im Marinobufagin gewinnen können: Acetyl-tetrahydro-marinobufagin zeigte im IR. eine charakteristische Bande bei 3,318 μ , die auf Grund der Befunde von HENBEST und Mitarb.⁵⁾ der CH-Schwingung einer sekundär-tertiären Epoxydgruppe zuzuordnen ist. REICHSTEIN und Mitarb.⁴⁾ sprachen deshalb die Vermutung aus, dass dieser Oxydsauerstoff in Analogie zum Resibufogenin²⁾ sich in 14,15-Stellung des Steroidskelettes befinden dürfte. Gleichzeitig und unabhängig davon kam auch THIESSEN⁶⁾ auf Grund theoretischer Überlegungen, die auf unseren früheren Abbauprobungen¹⁾ basierten, zur selben Annahme.

Wie im folgenden ausgeführt wird, liess sich nun auf chemischem Wege die für Marinobufagin postulierte Formel I exakt beweisen. Nach dieser unterscheidet sich Marinobufagin von dem in seiner Konstitution aufgeklärten Resibufogenin²⁾ einzig durch eine HO-Gruppe an C-5. Wir versuchten deshalb, diese beiden Bufadienolide über das 5-Anhydro-marinobufagin (III)¹⁾ miteinander zu verknüpfen⁷⁾: Resi-

¹⁾ II. Mitt., S. PATAKI & K. MEYER, *Helv.* **38**, 1631 (1955).

²⁾ 17. Mitt., H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **42**, 807 (1959).

³⁾ H. JENSEN, *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 767 (1937).

⁴⁾ H. SCHRÖTER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **41**, 720 (1958).

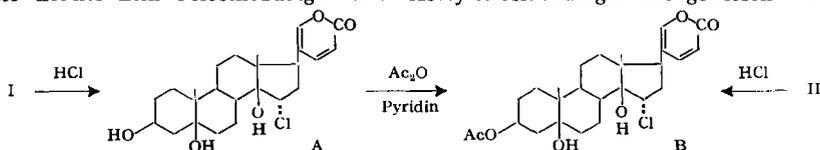
⁵⁾ H. HENBEST, G. D. MEALAS, D. NICHOLLS & K. J. TAYLOR, *J. chem. Soc.* **1957**, 1459.

⁶⁾ W. E. THIESSEN, *Chemistry & Ind.* **1958**, 440.

⁷⁾ Naheliegender wäre eigentlich der Versuch einer direkten Verknüpfung von Marinobufagin mit Telocinobufagin durch Reduktion der Oxido- zur 14 β -Hydroxy-Gruppe gewesen. Am Beispiel des Resibufogenins schien aber bei der Einwirkung von $NaBH_4$ oder $LiBH_4$ kein Bufalin zu entstehen²⁾. Allerdings war bei diesen Versuchen der Verlauf der Reduktion nur papierchromatographisch und nicht präparativ verfolgt worden. Bilden sich die gesuchten Reduktionsprodukte aber nur in Mengen von 5–10%, so lassen sie sich im Papierchromatogramm neben der grossen Menge an unverändertem Ausgangsmaterial und anderen Produkten kaum nachweisen und können leicht übersehen werden. (Vgl. die folgende Mitteilung dieser Reihe.) – Eine andere Möglichkeit der direkten Verknüpfung von Marinobufagin mit Telocinobufagin wäre auch vom Hydrochlorid oder Chlorhydrin des Marinobufagins ausgehend denkbar. Am Beispiel des Resibufogenins war nämlich gezeigt worden, dass dessen Chlorhydrin bei der Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin eine kristallisierte Acetylverbindung gibt, die identisch ist mit dem Reaktionsprodukt aus Acetylresibufogenin und HCl ⁸⁾. Dasselbe Verhalten fanden wir auch beim Marinobufagin. Daraus folgt, dass der Epoxydring in 14 β ,15 β -Stellung sich in der Weise öffnet,

bufogonon (IV)⁸⁾ wurde mit Bromsuccinimid bromiert und das so gewonnene rohe Bromierungsprodukt direkt mit Pyridin bei 135° umgesetzt. Bei der chromatographischen Aufteilung an Al₂O₃ konnte eine kleine Menge Kristalle gewonnen werden, die zwar nicht ganz einheitlich waren und deshalb einen etwas tieferen Smp. als das gesuchte 5-Anhydro-marinobufagon (III) aufwiesen. Mit Hilfe der Papierchromatographie liess sich aber zeigen, dass dieses uneinheitliche Kristallisat tatsächlich zur Hauptsache (mindestens zu 80%) aus 5-Anhydro-marinobufagon bestand, während der Rest sich als Ausgangsmaterial IV erwies. Bei der Wiederholung dieser Reaktionsfolge und unter Anwendung der präparativen Papierchromatographie hätte zweifellos schliesslich das aus Resibufogonon erhaltene 5-Anhydro-marinobufagon (III) in einheitlichen Kristallen gewonnen werden können. Wir haben aber davon abgesehen, weil das Ergebnis der papierchromatographischen Identifizierung von III sehr eindeutig ausgefallen war und somit als ausreichender Beweis für die geglückte Verknüpfung von Marinobufagin mit Resibufogonin betrachtet werden kann. Ausserdem lag es uns besonders daran, in diesem Zusammenhang nochmals die KMnO₄-Oxydation von Acetylmarinobufagin (II) durchzuführen, um gewisse Unklarheiten, die sich früher¹⁾ bei dieser Abbaumethode ergeben hatten, zu klären. Dabei sollte es auch möglich sein, weitere Beweise für die Richtigkeit der Formel I für Marinobufagin zu erbringen.

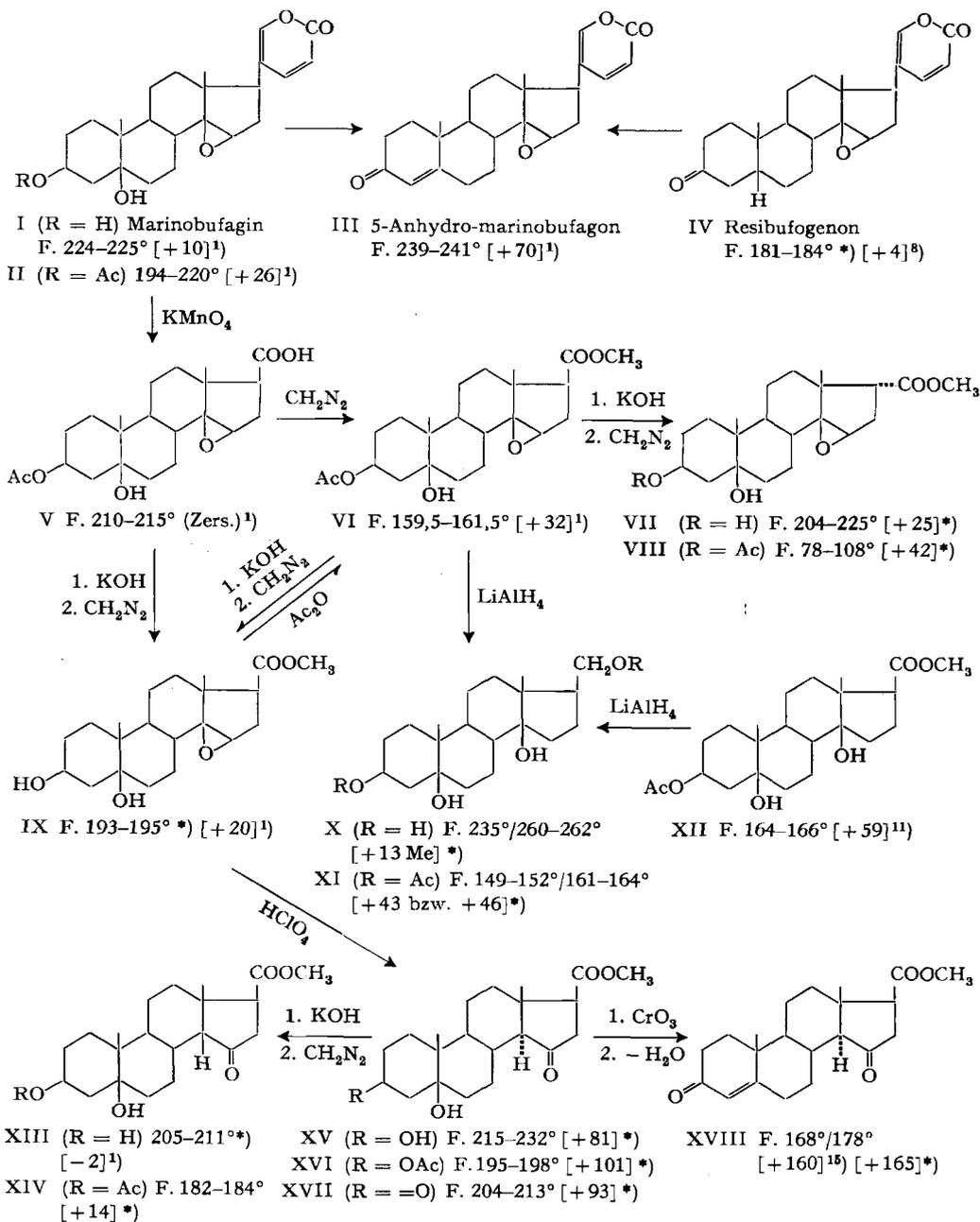
Wir fanden nun, dass bei vorsichtiger Durchführung des KMnO₄-Abbaus von Acetylmarinobufagin (II) sich, entgegen den früheren Befunden¹⁾, reproduzierbar und ohne Schwierigkeiten die diesem zu Grunde liegende acetylierte Ätiansäure V in durchschnittlich 45-proz. Ausbeute in Kristallen gewinnen lässt, die nach Methylierung den bekannten Ester VI gab¹⁾, der einheitlich war. Die methylierten Mutterlaugen von V blieben auch nach chromatographischer Aufteilung an Al₂O₃ grösstenteils amorph – es konnte lediglich noch eine geringe Menge des kristallisierten Methyl-esters VI gewonnen werden – und stellten, wie die papierchromatographische Untersuchung zeigt, dass die 14β-Hydroxy-15α-chlor-Verbindung entsteht und nicht die 14α-Chlor,15β-hydroxy-Verbindung. (Letztere müsste bei der Acetylierung ein 15β-Acetoxy-Derivat geben und mit CrO₃ zu einem 15-Keton dehydrierbar sein, was aber nicht der Fall ist; was das letztere betrifft, vgl. die Bereitung von Resibufogonon aus «Resibufogonin-hydrochlorid»⁸⁾ und diejenige aus kristallisiertem Resibufogonin im Exper. Teil dieser Arbeit.) Auf Grund dieser Beobachtungen käme somit dem Chlorhydrin des Marinobufagins die Formel A und seiner Acetylverbindung die Formel B zu⁹⁾. Bei der papierchromatographischen Untersuchung der durch Reduktion der beiden Chlorverbindungen A und B mit Zn-Staub in Eisessig erhaltenen rohen Reaktionsprodukte konnte kein Telocinobufagin bzw. Acetyltelocinobufagin nachgewiesen werden. –



Wir werden diese hier geschilderte Möglichkeit einer direkten Verknüpfung von Marinobufagin mit Telocinobufagin noch weiterverfolgen, da sie im Erfolgsfalle für die Konstitutionsaufklärung von 14,15-Epoxy-bufadienoliden von prinzipieller Bedeutung wäre.

⁸⁾ K. MEYER, Helv. 35, 2444 (1952).

⁹⁾ Diese Öffnung des Epoxydringes ist also entgegen der MARKOWNIKOFF-Regel erfolgt, wofür in der Steroidreihe noch andere Beispiele vorliegen; vgl. z. B. PL. A. PLATTNER, H. HEUSSER & A. B. KULKARNI, Helv. 32, 1070 (1949); PL. A. PLATTNER, H. HEUSSER & M. FEURER, Helv. 32, 587 (1949); L. F. FIESER, Exper. 6, 312 (1950); C. A. GROB & S. WINSTEIN, Helv. 35, 782 (1952).



*) Siehe Exp. Teil dieser Arbeit.

Ac = CH₃CO–; die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Zahlen auf- oder abgerundete spezifische Drehung an, wobei keine Bezeichnung Drehung in Chloroform, und Me Drehung in Methanol bedeutet.

suchung zeigte, ein Gemisch von mindestens 7 Stoffen dar, wovon allerdings 4 nur in recht geringer Menge vorhanden waren. Wir haben deshalb hier auf eine erneute Aufarbeitung und Untersuchung dieser amorphen Produkte verzichtet, konnten aber, wie weiter unten noch ausgeführt werden wird, eine Reihe früher daraus gewonnener Abbauprodukte¹⁰⁾ in ihrer Konstitution sicherstellen.

In Analogie zu der vor kurzem am Beispiel des Resibufogenins durchgeführten Reaktionsfolge haben wir den Acetoxyester VI mit LiAlH_4 reduziert, wobei $3\beta, 5, 14, 20$ -Tetrahydroxy-21-nor- $5\beta, 14\beta$ -pregnan (X) gebildet wurde, das wir als Diacetylverbindung XI charakterisierten. Dasselbe Tetrol X entstand bei der LiAlH_4 -Reduktion des 3β -Acetoxy-5,14-dihydroxy- $5\beta, 14\beta$ -ätiansäure-methylesters¹¹⁾ und gab bei der Acetylierung die eben erwähnte Diacetylverbindung XI. Die Identität dieser beiden auf verschiedenem Wege bereiteten Präparate von XI ergibt sich besonders eindeutig aus der völligen Übereinstimmung ihrer IR.-Spektren.

Damit ist eindeutig bewiesen, dass Marinobufagin ein $3\beta, 5\beta$ -Dihydroxy- $14\beta, x$ -oxido-Steroid ist. Dass die an C-14 haftende Oxidogruppe als $14\beta, 15\beta$ -Epoxyd ausgebildet ist, folgt einmal aus dem bereits erwähnten spektroskopischen Befund (Bande bei $3,318 \mu$) am Acetyl-tetrahydro-marinobufagin⁴⁾ und aus der oben geschilderten Verknüpfung von Marinobufagin mit Resibufogenin, dessen Oxidogruppe ja kürzlich²⁾ als $14\beta, 15\beta$ -ständig erkannt worden ist. Die 14,15-Stellung des Oxydsauerstoffs ergibt sich auch aus den folgenden Umsetzungen.

Bei der Einwirkung von katalytischen Mengen HClO_4 auf den Ester IX liess sich als einziges in Kristallen fassbares Produkt der Ketoester XV gewinnen¹²⁾. Das UV.-Absorptionsspektrum zeigte das für so einen Ester erwartete Maximum bei $292 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 1,43$). Das IR.-Spektrum wies eine stark assoziierte HO-Bande bei $3,00\text{--}3,05 \mu$ auf, während die übrigen Banden nichts besonderes zeigten. Der Ester XV liess sich als kristallisiertes Acetylderivat XVI charakterisieren und gab bei der Dehydrierung mit CrO_3 , wie zunächst mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie¹⁴⁾ festgestellt werden konnte, zwei Produkte, die sich durch Chromatographie an Silicagel präparativ voneinander trennen liessen. Die dabei zuerst gewonnene Substanz (Nebenprodukt) erwies sich als identisch mit 3,15-Diketo-ätien-(4)-säure-methylester (XVIII)¹⁵⁾, während die zweite Substanz, die das Hauptprodukt darstellte, erst mit polareren Lösungsmitteln eluiert werden konnte. Diese besitzt die Formel XVII und kann demzufolge leicht durch Erwärmen mit Eisessig unter Abspaltung von H_2O ebenfalls in XVIII übergeführt werden.

¹⁰⁾ Sie wurden dort¹⁾ mit den Nummern X, XI, XIV, XV und XVIII näher bezeichnet.

¹¹⁾ P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **30**, 2143 (1947); **31**, 622 (1948); vgl. auch K. MEYER, *Helv.* **32**, 1593 (1949).

¹²⁾ Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nach KIRCHER und Mitarb.¹³⁾, modifiziert nach E. STAHL, *Die Pharmazie* **11**, 633 (1956), konnten im rohen Reaktionsprodukt neben dem Ketoester XV, der das Hauptprodukt bildete, noch etwas Ausgangsmaterial IX und noch zwei polarere Substanzen nachgewiesen werden¹⁴⁾.

¹³⁾ I. G. KIRCHER, I. M. MILLER & G. I. KELLER, *Analyt. Chem.* **23**, 420 (1951).

¹⁴⁾ Dieses Verfahren wurde in jüngster Zeit auch von REICHSTEIN und Mitarb. zur Untersuchung von Steroiden mit Erfolg benützt; vgl. die diesbezügliche Arbeit von H. JÄGER, H. TOBIAS, E. WYSS, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **42**, im Druck. Herrn H. TOBIAS möchten wir auch hier bestens für seine uns freundlichst erteilten Ratschläge danken.

¹⁵⁾ Wir danken Herrn Dr. E. VISCHER von der CIBA A.G., Basel, bestens für die freundliche Überlassung von Vergleichsmaterial.

Das beim KMnO_4 -Abbau von Acetylmarinobufagin (II) früher¹⁾ erhaltene Säuregemisch war grösstenteils amorph und wurde von uns als «Acetoxysäure B» bezeichnet. Diese gab nach Methylierung und chromatographischer Aufteilung an Al_2O_3 nur amorphes Material = «Acetoxysäure-B-methylester». Aus der «Acetoxysäure B» wie auch aus deren Methylester konnte nach Verseifen mit KOH in Methanol, Methylierung mit Diazomethan und anschliessender Chromatographie ein als «Oxysäure-B₁-methylester» bezeichnetes kristallisiertes Produkt (Smp. 198–201°) erhalten werden, das bei der Acetylierung den «Acetoxysäure-B₁-methylester» (Smp. 171–177°) lieferte. Dieser Ester besitzt als auffallendstes Merkmal, zum Unterschied vom Abbauester VI aus Acetylmarinobufagin, eine Ketogruppe. Da der durch chromatographische Aufteilung an Al_2O_3 gereinigte «Acetoxysäure-B-methylester» auch nach Animpfen mit dem bei 171–177° schmelzenden «Acetoxysäure-B₁-methylester» nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte, vermuteten wir¹⁾, dass die Verseifung des «Acetoxysäure-B-methylesters» mit KOH von einer Umlagerung begleitet war. Dieselbe Umlagerung erfährt auch die amorphe «Acetoxysäure B» unter der Einwirkung von KOH, denn sie gibt nach Methylierung und Acetylierung ebenfalls den kristallisierten «Acetoxysäure-B₁-methylester». Die beim Abbau des Resibufogenins gemachten Beobachtungen²⁾ sprechen dafür, dass der früher aus Acetylmarinobufagin erhaltene amorphe «Acetoxysäure-B-methylester» zu einem erheblichen Ausmass aus dem Ketoester XVI bestanden hatte¹⁶⁾, welcher bei der Verseifung mit KOH und durch anschliessende Methylierung den kristallisierten Ester XIII («Oxysäure-B₁-methylester»¹⁾ geliefert hat. Letzterer gab dann bei der Acetylierung den Acetoxyster XIV. Diese Annahme konnten wir wie folgt beweisen: ein Gemisch der beiden Ester XV und XVI wurde mit KOH in Methanol-Wasser gekocht und das nach üblicher Aufarbeitung gewonnene rohe Verseifungsprodukt methyliert. Dieses (= XIII) erwies sich als einheitlich und war identisch mit dem «Oxysäure-B₁-methylester»¹⁾. Umsetzung mit Pyridin-Acetanhydrid gab den Ester XIV, der ebenfalls identisch war mit dem früher¹⁾ beschriebenen «Acetoxysäure-B₁-methylester»¹⁷⁾.

Bei der Verseifung der Acetoxysäure V mit KOH in wässrigem Methanol und Methylierung der dabei gebildeten Hydroxysäure war früher¹⁾ ein Ester vom Smp. 189–193° erhalten worden. Dieser hatte bei der Acetylierung ein als «Acetoxysäure-A₁-methylester» bezeichnetes Produkt gegeben, das scheinbar verschieden war vom Methylester VI. Dieser Befund muss nun auf Grund der kürzlich beim Abbau des Resinobufogenins gewonnenen Resultate als sehr zweifelhaft erscheinen. Dort konnte nämlich gezeigt werden, dass 14 β , 15 β -Oxido-ätiansäuren durch Alkali *keine* Isomerisierung an C-17 erfahren. Eine solche wird nur bei der Verseifung der 14 β , 15 β -Oxido-ätiansäureester beobachtet. Um diese Unstimmigkeit abzuklären, haben wir sowohl die Acetoxysäure V wie ihren Methylester VI mit KOH in wässrigem Methanol verseift. Die nach üblicher Aufarbeitung der Verseifungsansätze gewonnene rohe Säure wurde jeweils methyliert und hierauf an Al_2O_3 chromatographiert.

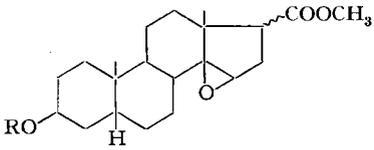
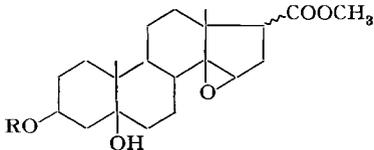
¹⁶⁾ Die Bildung der 15-Keto-Verbindung beim Abbau von II mit KMnO_4 kann nicht durch das Oxydationsmittel verursacht worden sein, sondern muss durch die zum Ansäuern der Oxydationsansätze verwendete H_2SO_4 bedingt sein.

¹⁷⁾ Am Beispiel der Abbausäuren aus 14 α - bzw. 14 β -Artebufogenin war schon gezeigt worden²⁾, dass die 15-Keto-14 α -ätiansäure durch Alkali leicht und quantitativ in die stabilere 15-Keto-14 β -ätiansäure umgelagert wird.

Im ersten Fall (Ausgangsmaterial Acetoxysäure V) erwies sich das dabei erhaltene Produkt als einheitlich und bestand ausschliesslich aus dem der Acetoxysäure V zugrunde liegenden $3\beta, 5$ -Dihydroxy- $14\beta, 15\beta$ -oxido- $5\beta, 14\beta$ -ätiansäure-methylester (IX) vom Smp. 193 – 195° und $[\alpha]_D = +21^\circ$. Dieser erwies sich als identisch mit dem früher erhaltenen «Oxysäure- A_1 -methylester» (Smp. 189 – 193° , $[\alpha]_D = +20^\circ$)¹⁾ und gab bei der Acetylierung den Acetoxyester VI.

Im zweiten Fall (Ausgangsmaterial Acetoxyester VI) ergab die chromatographische Aufteilung zwei Stoffe. Der polarere war identisch mit dem obigen Ester IX. Der zuerst eluierte Ester schmolz bei 204 – 225° . Auf Grund der spezifischen Drehung (vgl. Tab.) und in Analogie zu den Befunden, die bei der Verseifung des 3β -Acetoxy- $14\beta, 15\beta$ -oxido- $5\beta, 14\beta$ -ätiansäure-methylesters (aus Acetylresibufogenin) gemacht wurden, muss dem zuerst eluierten Ester (Smp. 204 – 225°) die Konstitution eines 17α -ätiansäureesters entsprechend Formel VII zukommen und seiner Acetylverbindung die Formel VIII.

Tabelle. $[\alpha]_D$ in Chloroform (auf ganze Grade auf- bzw. abgerundet)

		17 β	17 α
	R = H	+ 1	+ 8
	R = Ac	+ 4	+ 14
	R = H	+ 20	+ 25
	R = Ac	+ 32	+ 42

Die früher¹⁾ mit «Oxysäure- A_1 -methylester» und «Acetoxysäure- A_1 -methylester» bezeichneten Substanzen sind also mit dem Ester IX bzw. VI identisch, weshalb diese beiden Namen hinfällig geworden und zu streichen sind.

Der Direktion der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel, danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze bis $200^\circ \pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. Es werden folgende Abkürzungen benützt: AcOH = Eisessig, Ac₂O = Acetanhydrid, Ä = Äther, An = Aceton, Bz = Benzol, Chf = Chloroform, Fmd = Formamid, Hex = Hexan, Me = Methanol, Pe = Petroläther, Pn = Pentan, Py = Pyridin, W = Wasser.

Marinobufagin-chlorhydrin (A). 210 mg Marinobufagin (I) vom Smp. 219 – 224° wurden in 3 ml Chf gelöst, mit 6 ml einer bei 20° bereiteten gesättigten Lösung von trockenem HCl in Chf versetzt und 16 Std. bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde im Scheidetrichter erst mit verd. Sodalösung entsäuert, dann mit W gewaschen, über Sulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (240 mg) gab aus einem Gemisch von An-Chf-Me beim Eindampfen 73 mg reines Chlorhydrin A in glänzenden, feinen Blättchen vom Smp. 211 – 212° (Zers.)¹⁸⁾;

¹⁸⁾ Die Smp.-Werte sind infolge der Zersetzung der Substanz abhängig von der Heizgeschwindigkeit. Diese betrug von 200° weg etwa $3^\circ/\text{Min}$.

$[\alpha]_D^{20} = +22,0^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,644$ in Me). Aus der Mutterlauge liessen sich noch 72 mg Kristalle vom Smp. 203–208° (Zers.) und 20 mg Kristalle vom Smp. 173–180° isolieren.

$C_{24}H_{33}O_5Cl$ (436,96) Ber. C 65,96 H 7,61% Gef. C 66,18 H 7,74%

Acetylmariobufagin-chlorhydrin (B). a) Aus Mariobufagin-chlorhydrin (A). 70 mg A vom Smp. 211–213° (Zers.) wurden in 1,5 ml Py gelöst, mit 1,0 ml Ac_2O versetzt und 14 Std. bei 45° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chf, Neutralwaschen mit verd. HCl, verd. Sodalösung und W, Trocknen über Sulfat, Filtrieren und Eindampfen wurden 80 mg Rohprodukt erhalten, das zum Unterschied vom Ausgangsmaterial A in den üblichen Lösungsmitteln leicht löslich war. Aus An glänzende, feine Blättchen vom Smp. 204–205° (Zers.)¹⁸⁾; $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,994$ in Me).

b) Aus Acetylmariobufagin (II). 200 mg II vom Smp. 195–222° wurden in 1 ml Chf gelöst, mit 6 ml einer bei 20° bereiteten gesättigten Lösung von trockenem HCl in Chf versetzt und 14 Std. bei 20° stehengelassen. Analoge Aufarbeitung wie bei A gab 225 mg Rückstand. Aus An 120 mg Kristalle, die zunächst nicht ganz einheitlich waren¹⁹⁾. Nach dem Umlösen aus An feine, glänzende Blättchen; Smp. und Misch-Smp. mit dem unter a) erhaltenen Chlorhydrin 204–205° (Zers.)¹⁸⁾.

Resibufogenon (IV) aus *Resibufogenin*. 1,0 g Resibufogenin vom Smp. 113–140°/155–168° (aus An/W) wurde in 10 ml AcOH gelöst und bei 20° im Laufe von 4 Std. portionsweise mit insgesamt 11 ml 2-proz. CrO_3 -AcOH-Lösung versetzt. Dann wurde mit einigen Tropfen Me versetzt und 16 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung (Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen mit W und Chf-Ä (1:4), Waschen der organischen Phase mit verd. H_2SO_4 , verd. Sodalösung und W, Trocknen über Sulfat und Eindampfen) gab 980 mg Rohprodukt. Aus An-Ä 800 mg Kristalle (glänzende, lange Prismen) vom Smp. 177–180°. Umlösen aus An gab 600 mg IV vom Smp. 179–182° und 150 mg vom Smp. 178–181°; Misch-Smp. mit dem aus Resibufogeninhydrochlorid erhaltenen Resibufogenon⁸⁾²⁰⁾ vom Smp. 179–183° ohne Depression.

5-Anhydro-mariobufagon (III) aus *Resibufogenon* (IV). 250 mg IV vom Smp. 179–182° wurden in 20 ml CCl_4 gelöst, mit 117 mg Bromsuccinimid (entspr. 1 Äquivalent) versetzt und 30 Min. auf dem Dampfbad im Sieden gehalten. Nach dem Erkalten wurde vom Ungelösten abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockne gebracht, der Rückstand in Chf-Ä (1:4) aufgenommen und im Scheidetrichter mit verd. HCl, verd. Sodalösung und W gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Sulfat, Filtrieren und Eindampfen wurde der Rückstand (400 mg) an 8 g neutralem Al_2O_3 chromatographiert. Mit Pe-Bz (1:3) liessen sich total 170 mg eines gelbbraunen Öls eluieren, das stark halogenhaltig war (BEILSTEIN-Probe) und nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Die späteren Fraktionen mit reinem Bz und Bz-Chf-Gemischen enthielten unverändertes Ausgangsmaterial (140 mg). Das zuerst eluierte gelbbraune Öl (170 mg) wurde in 10 ml trockenem Py gelöst und in zugeschmolzener Ampulle 1 Std. auf ca. 140° erhitzt (Xyloldampf). Das nach üblicher Aufarbeitung gewonnene Rohprodukt wurde an neutralem Al_2O_3 chromatographiert. Die ersten Fraktionen mit Bz-Chf (9:1) bestanden nach Papierchromatogramm [Fmd/Hex-Bz(1:1)] zur Hauptsache aus Resibufogenon (IV) und enthielten nur wenig des gesuchten Stoffes III, während die späteren Eluate mit demselben Lösungsmittel das umgekehrte Verhältnis aufwiesen. Letztere gaben aber nur 26 mg Rückstand und wurden nochmals an Al_2O_3 chromatographiert. Bz-Chf (19:1) eluierte etwa 10 mg Material. Aus An-Ä ca. 5 mg Kristalle vom Smp. 208–226°, die im Gemisch mit authentischem 5-Anhydro-mariobufagon (III) vom Smp. 232–238°¹⁾ keine Depression zeigten und im oben erwähnten Papierchromatogramm zwei Flecke gaben. Der grössere, mit einem Rf-Wert von 0,4, entsprach in Färbung (mit $SbCl_5$) und Wanderungsgeschwindigkeit genau dem 5-Anhydro-mariobufagon (III), während der zweite, bedeutend kleinere Fleck, mit einem Rf-Wert von 0,6, dem Resibufogenon (IV) zukam. Das Verhältnis der beiden Ketone III und IV dürfte etwa 4:1 betragen haben.

3 β -Acetoxy-5-hydroxy-14 β ,15 β -oxido-5 β ,14 β -ätiensäure (V) und deren *Methylester* (VI). 3,1 g Acetylmariobufagin (II) vom Smp. 195–222° wurden in 20 ml Aceton gelöst und im Laufe von

¹⁸⁾ Bei der papierchromatographischen Untersuchung im System Pe-Bz(4:6)/Propylen-glycol-W(4:1) wurde ein Hauptfleck erhalten sowie ein kleinerer Fleck eines langsamer laufenden Nebenproduktes.

²⁰⁾ Das Belegpräparat besass jetzt den angegebenen Smp. Der früher⁸⁾ zu 186–188° bestimmte Smp. ist etwas zu hoch. Wir konnten jetzt im besten Fall 181–184° finden.

15 Min. unter ständigem Umschwenken portionsweise mit insgesamt 2,4 g fein gepulvertem KMnO_4 versetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Temperatur zwischen 20 und 25° blieb. In genau gleicher Weise wurden noch 1,2 g gepulvertes KMnO_4 im Laufe von 20 Min. und schliesslich noch 1,5 g KMnO_4 während 10 Min. eingetragen. Hierauf wurde das Reaktionsgemisch noch 3 Std. auf langsam laufender Schüttelmaschine in ständiger Bewegung gehalten. Nach dieser Zeit war praktisch alles KMnO_4 verbraucht. Nun wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, die dunklen Brocken im Mörser leicht zerdrückt und das resultierende feine Pulver mit so viel W versetzt, bis sich ein dünner Brei gebildet hatte. Dieser wurde mit verd. H_2SO_4 eben kongosauer gemacht, dreimal mit dem 3–4fachen Volumen Chf durchgeschüttelt und hierauf zentrifugiert. Die dunkelbraun gefärbten Chf-Auszüge wurden der Reihe nach je einmal mit W gewaschen, über Sulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum stark eingeeengt. Beim Versetzen mit viel Äther bildeten sich dunkle, leicht sedimentierende Flocken. Die überstehende Lösung war praktisch wasserhell und konnte durch Dekantieren vom ausgefallenen, flockigen MnO_2 befreit werden. Letzteres wurde durch Aufschlemmen in einem Gemisch von Ä-Chf (9:1), Sedimentierenlassen und Abdekantieren ausgewaschen. Die Ä-Chf-Auszüge wurden im Vakuum konzentriert, wobei die Acetoxysäure V bereits kristallisierte. Ausbeute 1,35 g rohes Kristallinat. Nach zweimaligem Umlösen aus An lag der Smp. bei 205–215°. Eine durch wiederholtes Umkristallisieren gewonnene Spitzenfraktion schmolz bei 228–229° (Zers.)²¹⁾. Der aus V mit ätherischer Diazomethanlösung bereitete Methylester VI schmolz bei 155–161°; eine durch wiederholtes Umlösen aus An-Ä gewonnene Spitzenfraktion schmolz bei 161–162°.

3 β , 5, 14, 20-Tetrahydroxy-21-nor-5 β , 14 β -pregnan (X) und 3 β , 20-Diacetoxy-5, 14-dihydroxy-21-nor-5 β , 14 β -pregnan (XI). – 1. Durch Reduktion des Abbauesters VI aus Acetylmariobufagin (II). 117 mg Acetoxysäure V vom Smp. 205–215° wurden mit überschüssiger ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach Abklingen der Reaktion wurde die entstandene Lösung im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 20 ml trockenem Äther gelöst, die so bereitete Lösung in die Suspension von 250 mg LiAlH_4 in 20 ml trockenem Äther unter Umschwenken langsam eingetropft, während 1 Std. gerührt und dann 15 Std. bei 20° stehengelassen. Hierauf wurde unter Kühlen mit verd. H_2SO_4 kongosauer gemacht und die Ätherlösung im Scheidetrichter neutral gewaschen und in üblicher Weise aufgearbeitet: 104 mg neutrales Rohprodukt. Aus Me-Ä 47 mg rechteckige Prismen vom Doppel-Smp. 235°/260–262°; $[\alpha]_D = +13,8^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,7768$ in Chf). 40 mg dieses Tetrols X wurden in 0,5 ml Py und 0,4 ml Ac_2O acetyliert und gaben nach üblicher Aufarbeitung 43 mg Rohprodukt: aus Ä-Pn 28 mg Nadelchen vom Smp. 72–75°. Nach dem Umlösen aus Ä-Pn wurde der Doppel-Smp. 149–152°/161–164° beobachtet; $[\alpha]_D^{20} = +42,6^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,7518$ in Chf).

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (422,54) Ber. C 68,22 H 9,07% Gef. C 68,51 H 9,22%

2. Durch Reduktion von 3 β -Acetoxy-5, 14-dihydroxy-5 β , 14 β -ätiansäure-methylester (XII)¹⁴⁾. 72 mg XII vom Smp. 160–166° wurden in 10 ml trockenem Ä gelöst, unter Rühren langsam in eine Suspension von 250 mg LiAlH_4 in 20 ml Ä unter Umschwenken getropft und 15 Std. bei 20° stehengelassen. Die Aufarbeitung geschah wie oben unter 1. beschrieben: 59 mg neutrales Rohprodukt. Aus Me-Ä 35 mg rechteckige Prismen vom Smp. 220–252°, die nach dem Umlösen keinen deutlichen Doppel-Smp. zeigten und bei 229–258° schmolzen; $[\alpha]_D^{25} = +13,3^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,6739$ in Me). Misch-Smp. mit dem unter 1. beschriebenen Tetrol X ohne Depression. – 34 mg dieses Tetrols X wurden in 0,5 ml Py und 0,5 ml Ac_2O acetyliert und gaben nach üblicher Aufarbeitung 43 mg Rohprodukt. Aus Ä-Pn 30 mg Nadelchen vom Doppel-Smp. 152–154°/162–165°; $[\alpha]_D = +46^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,650$ in Chf). Misch-Smp. mit der aus VI erhaltenen Diacetoxyverbindung XI ohne Depression. Auch die IR.-Spektren der beiden nach 1. und 2. bereiteten Präparate von XI zeigten völlige Übereinstimmung.

3 β , 5-Dihydroxy-14 β , 15 β -oxido-5 β , 14 β -ätiansäure-methylester (IX). – 1. Durch Verseifen der Acetoxysäure V. 300 mg Acetoxysäure V vom Smp. 200–208° (Zers.) wurden in 10 ml Me gelöst, mit 1,5 ml 25-proz. KOH-Lösung versetzt und 10 Std. bei 37° stehengelassen. Nach Verdampfen des Me im Vakuum unter Zugabe von etwa 5 ml W wurde mit verd. H_2SO_4 versetzt und erschöpfend mit Chf extrahiert. Die Chf-Auszüge gaben nach dem Waschen mit W, Trocknen über Sulfat,

²¹⁾ Nach einiger Zeit verändert sich der Smp. (vermutlich infolge Isomerisierung zur 15-Keto-Verbindung) und wird bei 223° > 260° (Zers.) gefunden.

Filtrieren, Eindampfen, Verflüssigen des Rückstandes mit wenig Me, Versetzen mit überschüssigem ätherischem Diazomethan und völligem Eindampfen im Vakuum 272 mg Rückstand. Aus An-Ä dicke Prismen von IX (215 mg), Smp. 189–192,5°²²⁾; $[\alpha]_D^{25} = +21,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,575$ in Chf). Die Mutterlauge (57 mg) wurde an Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Bz-Chf (7:3) eluierte Substanz gab noch 42 mg Ester IX vom Smp. 189–193°. Eine Spitzenfraktion (nach zweimaligem Umlösen aus An-Ä) schmolz bei 193–195°. – Acetylierung: 200 mg IX wurden wie üblich in Py-Ac₂O acetyliert und gaben aus An-Ä schön ausgebildete rhombische Platten vom Smp. 158–161°, die nach zweimaligem Umlösen aus An-Ä bei 161–162° schmolzen und mit dem oben beschriebenen Präparat von VI keine Depression gaben.

2. Durch Verseifen des Acetoxysäure-methylesters VI. 790 mg des Esters VI vom Smp. 159–162° wurden in 26 ml Me gelöst, mit 4,0 ml 25-proz. KOH versetzt und 10 Std. bei 40° stehengelassen. Analoge Aufarbeitung wie oben unter 1. beschrieben gab 710 mg rohes Methylestergemisch, das an 30 g Al_2O_3 sorgfältig aufgeteilt wurde (Fraktionen von 70 ml). Es wurde zunächst mit Bz (2 Fraktionen) und dann mit Bz-Chf (19:1), (9:1) und (4:1) (je 3 Fraktionen) durchgewaschen. Erst von der 12. Fraktion weg [Bz-Chf (7:3)] liess sich Substanz von der Säule ablösen. Die Fraktionen 12–20 [7 Fraktionen mit Bz-Chf (7:3) und 2 Fraktionen (3:2)] hinterliessen nach dem Eindampfen total 325 mg einheitliche Substanz (siehe weiter unten). Die Fraktionen 21–24 [Bz-Chf (3:2)] (125 mg) waren ölig. Die Fraktionen 25–26 [Bz-Chf (1:1)], 27–28 [Bz-Chf (1:3)] und 29–30 [Bz-Chf (1:9)] hinterliessen nach dem Eindampfen 220 mg Substanz. Aus An-Ä nach zweimaligem Umlösen 160 mg glänzende, rhombische Blättchen vom Smp. 190–195°, die sich identisch erwiesen mit dem Ester IX.

3 β ,5-Dihydroxy-14 β ,15 β -oxido-5 β ,14 β ,17 α -ätiansäure-methylester (VII) und 3 β -Acetoxy-5-hydroxy-14 β ,15 β -oxido-5 β ,14 β ,17 α -ätiansäure-methylester (VIII). Die 325 mg Substanz aus den Fraktionen 12–20 des oben erwähnten Chromatogramms gaben aus An-Ä 260 mg Kristalle, die nach zweimaligem Umlösen aus An-Ä und einmaligem Umkristallisieren aus An allein dicke, lange Prismen von VII gaben, die bei 204–225° schmolzen; $[\alpha]_D^{23} = +24,7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,317$ in Chf). 240 mg VII vom Smp. 204–225° wurden in 1 ml Py gelöst, mit 0,7 ml Ac₂O versetzt und 16 Std. bei 35° stehengelassen. Das nach üblicher Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt (270 mg) wurde an 8 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Pe-Bz (1:1) und (1:3) sowie Bz und Bz-Chf (9:1) und (4:1) eluierten Anteile gaben aus Ä-Pn Kristalle, die zunächst alle zwischen 75 und 92° schmolzen. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Ä-Pn grobe Prismen von VIII, vom Smp. 78–108°; $[\alpha]_D^{20} = +41,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,931$ in Chf).

3 β ,5-Dihydroxy-15-keto-5 β -ätiansäure-methylester (XV) und 3 β -Acetoxy-5-hydroxy-15-keto-5 β -ätiansäure-methylester (XVI). 140 mg IX vom Smp. 179–191°, in 15 ml An gelöst, wurden mit 0,001 ml HClO₄²⁾ 10 Min. auf 70° erwärmt. Übliche Aufarbeitung gab 140 mg Rohprodukt. Dieses gab im Dünnschichtchromatogramm (AcOH-Cyclohexan (1:1)) 4 Flecke: der grösste und am raschesten wandernde Fleck wurde durch den gesuchten Ester XV hervorgerufen, ein wesentlich kleinerer und etwas langsamer wandernder Fleck war durch Ausgangsmaterial IX bedingt. Die restlichen beiden Flecke waren sehr klein und zeichneten sich durch eine sehr kurze Laufstrecke aus. Das ganze Rohprodukt wurde deshalb an 4,5 g Silicagel chromatographiert (Fraktionen von 15 ml). Aus den mit Bz-Chf (3:7) (2 Fraktionen) und Chf (3 Fraktionen) eluierten Anteilen (total 113 mg) konnten 96 mg Kristalle von XV erhalten werden, die bei 207–228° schmolzen. Umlösen aus Chf-Ä gab 70 mg Prismen vom Smp. 215–232°; $[\alpha]_D^{23} = +81,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,046$ in Chf). UV.-Absorptionsspektrum: $\lambda_{max} = 292 m\mu$, $\log \epsilon = 1,43$ (in Alkohol). – Acetylierung: 50 mg XV vom Smp. 215–222° wurden in Py-Ac₂O 16 Std. bei 40° stehengelassen. Das nach üblicher Aufarbeitung gewonnene rohe Acetat wurde aus An-Ä zweimal umkristallisiert und gab dabei rhombische Platten von XVI vom Smp. 195–198° (Sint. ab 185°); $[\alpha]_D^{25} = +101,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,396$ in Chf).

3,15-Diketo-5-hydroxy-5 β -ätiansäure-methylester (XVII). 120 mg XV vom Smp. 215–232°, in 6 ml AcOH gelöst, wurden zunächst mit 0,4 ml einer 2-proz. CrO₃-AcOH-Lösung und dann im Laufe von 8 Std. portionsweise (0,2 ml) mit weiteren 1,4 ml derselben CrO₃-Lösung versetzt. Nach Zusatz von einigen Tropfen Me und Stehenlassen während 16 Std. wurde in üblicher Weise aufgearbeitet. Es resultierten 90 mg Neutralprodukt, das aus Chf-Ä 72 mg Kristalle vom Smp.

²²⁾ Die Mischprobe mit dem früher¹⁾ beschriebenen «Oxysäure-A₁-methylester» vom Smp. 189–193° ($[\alpha]_D = +20^\circ$) schmolz ebenso.

176-192° gab, die im Dünnschichtchromatogramm (Essigester-Cyclohexan (1:4)) 2 Flecke verursachten. Kristalle und Mutterlaugen wurden vereinigt und an 3 g Silicagel chromatographiert. Bz-Chf (4:1) eluierte in 4 Fraktionen zu je 10 ml total 12 mg Substanz. Alle diese Fraktionen gaben nach dem Eindampfen aus Ä-Pn dieselben prismat. Nadeln vom Smp. 168-177° (= XVIII, siehe weiter unten). Die 3 folgenden Fraktionen mit Bz-Chf (3:2) eluierten nur 4 mg Öl. Aus den nächsten Fraktionen mit Bz-Chf (2:3) und 1 Fraktion mit Chf allein wurden total 44 mg Rückstand erhalten; aus Chf-Ä Prismen vom Smp. 202-210° (Sintern ab 170°). Nach dem Umkristallisieren aus Chf-Ä 37 mg Prismen, Smp. 204-213° (Sint. ab 170°); $[\alpha]_D^{24} = +93,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,151$ in Chf). UV.-Spektrum: λ_{\max} 282-286 μ , $\log \epsilon = 1,61$ (in Alkohol) (Diketon!).

3,15-Diketo-ätiën-(4)-säure-methylester (XVIII). 30 mg XVII vom Smp. 204-213° wurden in 4 ml AcOH gelöst und 20 Min. auf 60° erwärmt. Nach üblicher Aufarbeitung 27 mg Rohprodukt. Dieses wurde an 1 g Silicagel chromatographisch aufgeteilt. Analog wie bei der oben beschriebenen Chromatographie (siehe unter Ester XVII) wurde zunächst der Ester XVIII eluiert. Es konnten total 5 mg feine Prismen vom Smp. 168-176° erhalten werden. Die Hauptmenge (20 mg) war unverändertes Ausgangsmaterial XVII. Gemeinsames Umlösen der oben erhaltenen Kristalle von XVIII (siehe unter Ester XVII) mit den hier gewonnenen Kristallen von XVIII (total 14 mg) gab 9 mg Nadeln vom Smp. 168-169° unter Wiedererstarren zu Rhomben, die bei 178° schmolzen. Misch-Smp. mit genau gleich schmelzendem authentischem 3,15-Diketo-ätiën-(4)-säure-methylester¹⁵⁾ ohne Depression; $[\alpha]_D^{25} = +165^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,7309$ in Chf). Das UV.-Spektrum zeigte das erwartete Maximum bei 238 μ ($\log \epsilon = 4,21$). Die IR.-Spektren der Vergleichssubstanz¹⁵⁾ und des hier beschriebenen Esters XVIII zeigten völlige Übereinstimmung.

3 β ,5-Dihydroxy-15-keto-5 β ,14 β -ätiënsäure-methylester (XIII) und 3 β -Acetoxy-5-hydroxy-15-keto-5 β ,14 β -ätiënsäure-methylester (XIV). 20 mg Hydroxyester XV vom Smp. 210-230° und 20 mg des Acetoxyesters XVI vom Smp. 194-198° wurden in 5 ml Me gelöst, mit 1 ml 25-proz. KOH-Lösung versetzt und 2 Std. auf dem Dampfbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit verd. HCl neutralisiert, im Vakuum vom Me befreit, mit verd. HCl eben kongosauer gemacht, mit Chf-Ä (1:4) ausgeschüttelt und die Chf-Ä-Lösung wie üblich aufgearbeitet: 35 mg Rohprodukt. Dieses wurde in einigen Tropfen Me gelöst, mit ätherischer Diazomethanlösung methyliert und im Vakuum vom Lösungsmittelgemisch befreit. Der Rückstand gab aus An-Ä 29 mg lange, dünne Prismen (= XIII) vom Smp. 205-211°. Mischprobe mit dem «Oxysäure-B₁-methylester Smp. 198-201°», der jetzt bei 192-211° schmolz, bei 202-211°. - Acetylierung: 25 mg XIII vom Smp. 205-211° wurden in 10 Tropfen Py gelöst, mit 7 Tropfen Ac₂O versetzt und 24 Std. bei 40° stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurde an 1 g Al₂O₃ chromatographiert. Das mit Bz, Bz-Chf (19:1), (9:1) und (4:1) eluierte Material gab aus Ä-Pn feine Nadelchen vom Smp. 175-181°. Dieser stieg nach zweimaligem Umlösen aus Ä-Pn auf 182-184. Misch-Smp. mit dem «Acetoxy-säure-B₁-methylester Smp. 171-177°», der jetzt bei 172-178° schmolz, 176-184°; $[\alpha]_D^{22} = +14,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,119$ in Chf).

Die Mikroanalysen wurden im Mikrolabor der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel unter der Leitung von Herrn E. THOMMEN ausgeführt.

SUMMARY

On the basis of new degradation work it is shown that Marinobufagin is 3 β ,5-Dihydroxy-14 β ,15 β -epoxy-5 β -bufa-20,22-dienolide. At the same time the structure of the degradation products, which were described in our previous communication on this subject, could be elucidated.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel