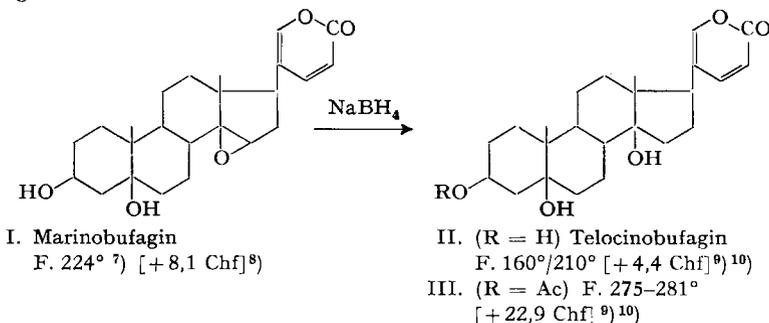


153. Die Überführung von Marinobufagin in Telocinobufagin¹⁾Über Krötengifte, 19. Mitteilung²⁾

von M. Bharucha, H. Jäger, K. Meyer, T. Reichstein und O. Schindler

(27. V. 59)

Für Resibufogenin, Marinobufagin und Bufotalinin sind von THIESSEN³⁾ Formeln mit einem 14 β ,15 β -Epoxydring vorgeschlagen worden. Eine gleiche Formel wurde unabhängig und fast gleichzeitig für Resibufogenin von MEYER & LINDE⁴⁾ abgeleitet und experimentell bewiesen. Damit ist auch Formel I für Marinobufagin sehr wahrscheinlich geworden, nachdem der Bau des A-Ringes von PATAKI & MEYER⁵⁾ abgeklärt war und die Anwesenheit eines Äthylenoxydrings von SCHRÖTER & Mitarbeitern⁶⁾ durch die Bande bei 3,32 μ im IR.-Spektrum des acetylierten Tetrahydroderivates demonstriert werden konnte. Der strenge Beweis für das Vorliegen des Sterinskeletts und die Lage des Äthylenoxydrings ist in vorstehender Mitteilung²⁾ erbracht worden. Wir beschreiben hier eine weitere Reaktion, die beides auf einem unabhängigen Wege sicherstellt.



Wir haben Marinobufagin mit NaBH₄ in wässrigem Äthanol bei pH = ca. 8–9 behandelt¹¹⁾. Die Kontrolle im Papierchromatogramm (Nr. 2 in Fig. 1 und 2) zeigte, dass nach 2 Std. noch ca. 75% Ausgangsmaterial (entspr. Fleck M) vorhanden war. Ausserdem waren aber noch ca. 5 Flecke von stärker polaren Stoffen sichtbar. Einer dieser Flecke (mit T bezeichnet) zeigte eine Laufstrecke und gleiche Färbung wie Telocino-

1) Auszug aus Diss. von Frl. M. BHARUCHA, Basel, die demnächst erscheint.

2) 18. Mitteilung: H. SCHRÖTER, R. REES & K. MEYER, *Helv.* **42**, 1385 (1959).

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

4) H. LINDE & K. MEYER, *Experientia* **14**, 238 (1958).

5) S. PATAKI & K. MEYER, *Helv.* **38**, 1631 (1955).

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

7) K. MEYER, *Helv.* **34**, 2147 (1951) und frühere Lit. daselbst.

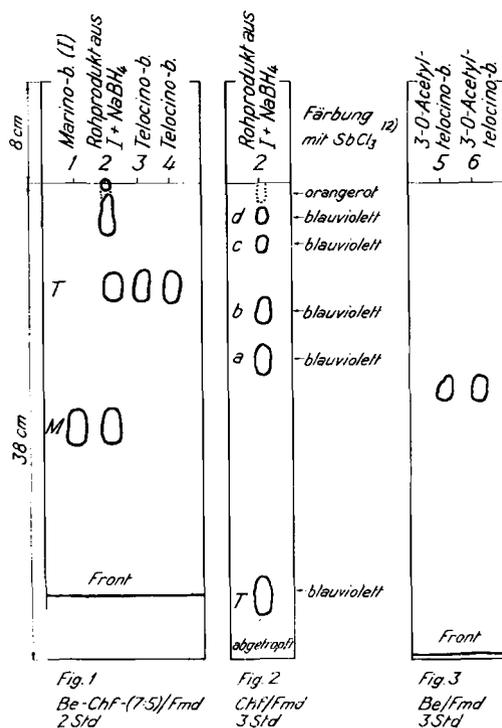
8) Fussnote 13, p. 16, bei PATAKI & MEYER⁵⁾.

9) K. MEYER, *Pharmac. Acta Helv.* **24**, 222 (1949).

10) K. MEYER, *Helv.* **32**, 1593 (1949).

11) Für einen anderen Zweck wollten wir prüfen, ob Marinobufagin gegen NaBH₄ beständig ist. Wie sich zeigte, ist dies nicht der Fall.

bufagin. Die präparative Isolierung durch Chromatographie an Al_2O_3 lieferte den entsprechenden Stoff in Kristallen. Er war nach Smp., Drehung, Mischprobe, Laufstrecke im Papierchromatogramm sowie Färbung mit SbCl_3 und 84-proz. H_2SO_4 mit authentischem Telocinobufagin identisch. Zur weiteren Charakterisierung wurde noch das 3-O-Acetyl-Derivat III bereitet, das ebenfalls mit authentischem Material identisch war. Die Ausbeute an rohen Kristallen betrug nur 5,2% der eingesetzten Menge, wobei aber 60% reines Ausgangsmaterial zurückgewonnen wurde.



Entwickelt durch Spritzen mit SbCl_3 in CHCl_3 und kurzes Erwärmen auf 110° ¹²⁾.

- 1 = 0,03 mg krist. Marinobufagin (I).
- 2 = 0,10 mg Rohprodukt erhalten aus Marinobufagin (I) mit NaBH_4 in wässrigem Äthanol.
- 3 = 0,02 mg krist. Telocinobufagin (II) authentisch.
- 4 = 0,03 mg₁ krist. Telocinobufagin (II) erhalten aus I mit NaBH_4 .
- 5 = 0,02 mg krist. 3-O-Acetyl-telocinobufagin (III) authentisch.
- 6 = 0,02 mg krist. 3-O-Acetyl-telocinobufagin (III) erhalten aus I mit NaBH_4 und Acetylierung.

Da die Konstitution und die Konfiguration von Telocinobufagin (II) durch Abbau bewiesen ist¹⁰⁾, wird durch obige Reaktion nun auch die Formel I von Marinobufagin sichergestellt.

Von den bei der Reduktion von I neben II entstehenden Stoffen wurde keiner in reiner Form isoliert. Möglicherweise verdanken einige davon ihre Entstehung einer hydrolytischen oder alkoholytischen Öffnung des Epoxydrings.

¹²⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. 34, 2278 (1951).

Die Reduktion von Marinobufagin wurde auch in wässrigem Dioxan durchgeführt. Nach 2 Std. waren auch hier im Papierchromatogramm neben viel Ausgangsmaterial ca. 4 langsamer laufende Flecke sichtbar, von denen einer wieder dieselbe Laufstrecke und Farbreaktion zeigte wie Telocinobufagin. Es gelang jedoch nicht, durch Chromatographie an Al_2O_3 Telocinobufagin in Kristallen zu isolieren.

Die Eine von uns (M.B.) dankt für Beiträge aus dem NIZAM's *Trust Fund*, Hyderabad, und aus dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung*.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber $\pm 3^\circ$. Die Adsorptionschromatographie nach dem Durchlaufverfahren¹³⁾ an Al_2O_3 (WOELM alkalifrei)¹⁴⁾ und die Ausführung der Papierchromatographie¹⁵⁾ erfolgte nach früheren Angaben. Substanzproben zur Drehungsbestimmung wurden 1 Std. bei $60\text{--}70^\circ$ und 0,02 Torr getrocknet. Alle Verhältniszahlen beziehen sich auf Volumenteile.

Für Lösungsmittel wurden folgende Abkürzungen verwendet: Ae = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Be = Benzol, Chf = Chloroform, Me = Methanol, Py = Pyridin, W = Wasser. Ferner bedeuten: Pchr = Papierchromatogramm, ML = eingedampfte Mutterlauge und Fr = Fraktion(en).

Reduktion von Marinobufagin in wässrigem Äthanol. 500 mg Marinobufagin, Smp. $209\text{--}217^\circ$, wurden in 40 ml 80-proz. wässrigem Alk gelöst, auf ca. -15° gekühlt und mit einer vorgekühlten Lösung von 150 mg NaBH_4 in 10 ml 80-proz. Alk versetzt. Durch tropfenweise Zugabe von verdünnter Essigsäure (0,3 ml Eisessig in 25 ml 80-proz. Alk) wurde der pH-Wert während der ganzen Reaktionsdauer zwischen 8 und 9 gehalten (Phenolphthalein schwach rosa). Nach zweistündigem Stehen bei 0° wurde mit 2-n. H_2SO_4 angesäuert (kongoblau), mit 120 ml Wasser versetzt und die Lösung bei $40\text{--}50^\circ$ Badtemperatur im Vakuum vom Alk befreit. Der wässrige Rückstand (ca. 100 ml), der einen flockigen Niederschlag enthielt, wurde 4mal mit je 300 ml Chf ausgeschüttelt. Die Chf-Extrakte wurden mit 60 ml 2-n. Na_2CO_3 (+ Eis) und 60 ml W gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (ca. 520 mg¹⁶⁾) wurde an 15 g neutralem Al_2O_3 chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 50 ml der in der Tabelle genannten Lösungsmittel.

Chromatographie des Reduktionsproduktes von Marinobufagin an Al_2O_3

Fr. Nr.	Lösungsmittel	Eindampfrückstand				
		roh		Kristalle aus An-Ae		
		mg ¹⁶⁾	Pchr ¹⁷⁾	mg	Smp	Pchr ¹⁷⁾
1-4	Be-Chf-(50:50) Be-Chf-(40:60)	9	—	—	—	—
5-9	Be-Chf-(25:75)	141	M	86	212-18	M
10-14	Chf	132	M	77	216-21	M
15	Chf-Me-(99:1)	171	M	87	216-21	M
16	Chf-Me-(99:1)	28	T(M)	18	194-200	T
17	Chf-Me-(98:2)	17	T(ab)	8	—	T(ab)
18-19	Chf-Me-(98:2)	15	T(abc)	—	—	—
20-25	Chf-Me-(95:5) Chf-Me-(90:10)	33	abcd	—	—	—

¹³⁾ T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Disc. Trans. Farad. Soc. **1949**, 305.

¹⁴⁾ M. WOELM, Eschwege (Deutschland).

¹⁵⁾ H. HEGEDÜS, CH. THAMM & T. REICHSTEIN, Helv. **36**, 357 (1953); O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. **34**, 108 (1951); E. SCHENKER, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, Helv. **37**, 680 (1954).

¹⁶⁾ Nur kurz bei $40\text{--}50^\circ$ und 12 Torr getrocknet, enthält deshalb noch etwas Lösungsmittel.

¹⁷⁾ In Klammern bedeutet schwacher Fleck.

Die *Fr.* 1–4 und 17–25 blieben amorph und wurden nicht weiter untersucht.

Aus *Fr.* 5–15 kristallisierten 250 mg Marinobufagin (M), Smp. 212–221°, in farblosen Prismen. Die vereinigten ML gaben aus An-Ac nochmals 53 mg Marinobufagin, Smp. 213–220°. Die Identifizierung mit dem Ausgangsmaterial (Smp. 209–217°) erfolgte durch Misch-Smp. (210–216°), Vergleich im Pchr und Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ und SbCl₃.

Die *Fr.* 16 gab aus An-Ac 18 mg Telocinobufagin in farblosen Prismen. Smp. 194–200°, $[\alpha]_D^{24} = +6,3 \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in Chf). Die Mischprobe mit authentischem Telocinobufagin (198 bis 207°)¹⁸⁾ schmolz bei 194–201°. Die Laufstrecken im Pchr (vgl. Nr. 4 in Fig. 1) waren bei beiden Präparaten gleich. Auch die Farbfolgen mit SbCl₃ auf Papier und mit 84-proz. H₂SO₄ auf der Tüpfelplatte waren identisch.

Mono-O-acetyl-Derivat. 7 mg Telocinobufagin, Smp. 194–200°, aus obigem Versuch wurden in je 0,1 ml Acetanhydrid u. Py gelöst und 20 Std. bei 37° stehengelassen. Dann wurde bei 50° im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 10 ml Chf gelöst und nacheinander je einmal mit 1 ml 2-n. HCl, W, 2-n. Na₂CO₃ und W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (8 mg) gab aus An-Ac 30 mg farblose Prismen, Smp. 253–259°. Misch-Smp. mit authentischem 3-O-Acetyl-telocinobufagin (Smp. 260–265°)¹⁸⁾ bei 251–262°.

Auf analoge Art wurden noch 15 mg ML der *Fr.* 16 und die nicht ganz reinen Kristalle von *Fr.* 17 acetyliert und aufgearbeitet. Der Rückstand (13 mg) gab nach Reinigung an SiO₂ (Korngröße 0,15–0,30 mm) aus An-Ac noch 3 mg krist. 3-O-Acetyl-telocinobufagin, Smp. 251–262°¹⁸⁾. Misch-Smp. mit dem Produkt aus reinem Telocinobufagin von *Fr.* 16 ohne Depression. Beide Präparate wurden daher zur Bestimmung der opt. Drehung vereinigt. $[\alpha]_D^{26} = +18^\circ \pm 6^\circ$ ($c = 0,32$ in Chf). Die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ und mit SbCl₃ waren gleich wie bei authentischem 3-O-Acetyl-telocinobufagin. Auch die Laufstrecken im Pchr stimmten überein (vgl. Nr. 6 in Fig. 3).

Reduktion von Marinobufagin in wässrigem Dioxan. 300 mg Marinobufagin (regenciertes Material aus dem ersten Versuch) wurden in 24 ml Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 90 mg NaBH₄ in 6 ml W versetzt. Dann wurde die Lösung auf ca. +15° gekühlt und durch tropfenweise Zugabe von verdünnter Essigsäurelösung (0,1 ml Eisessig in 8 ml Dioxan) auf pH 8–9 gehalten. Die analog dem ersten Versuch erfolgte Aufarbeitung gab ca. 350 mg Rückstand¹⁸⁾. Durch Chromatographie an 10 g neutralem Al₂O₃ liessen sich 136 mg krist. Marinobufagin, Smp. 216–220°, abtrennen. Die mit Chf-Me-(99:1) und -(98:2) eluierbaren Fraktionen enthielten nach Pchr Gemische von wenig Marinobufagin, Telocinobufagin und drei langsamer laufenden Stoffen. Da keine dieser Fraktionen kristallisierte, wurden sie vereinigt und nochmals an Al₂O₃ (BROCKMANN) chromatographiert. Alle Fraktionen erwiesen sich als Gemische und gaben auch nach Animpfen mit Telocinobufagin keine Kristalle.

Zusammenfassung

Marinobufagin (I) wurde durch Reduktion mit NaBH₄ in wässrigem Äthanol in geringer Ausbeute in Telocinobufagin (II) übergeführt. Diese Reaktion beweist Formel I für Marinobufagin. Daneben entstanden noch mindestens vier weitere Stoffe, die nicht untersucht wurden.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

¹⁸⁾ Es handelt sich in Wirklichkeit um Zersetzungspunkte, die stark von der Kristallgröße, Erhitzungsgeschwindigkeit etc. abhängig sind. Daher weichen unsere Werte teilweise merklich von den auf der Formelseite gegebenen Literaturwerten ab.