

3. The catalysis by 2-picoline and 2,6-lutidine is 3 times and 10 times smaller, respectively, than expected by the base strength of these pyridine homologues. In contrast to the protolytic reactions of pyridine derivatives, which *H. C. Brown* et al. investigated recently, these reactions show that steric strain may be important for selected proton transfer processes.

Wissenschaftliche Laboratorien des Farbendepartementes,
CIBA Aktiengesellschaft, Basel.

196. Zur Konstitution des Marinobufagins, II. Mitteilung¹⁾2).

Über Krötengifte, 9. Mitteilung³⁾

von **Stephan Pataki** und **Kuno Meyer**.

(26. VIII. 55.)

In einer vorangegangenen Mitteilung¹⁾ dieser Reihe war in Übereinstimmung mit Arbeiten früherer Autoren gezeigt worden, dass dem Marinobufagin mit grosser Wahrscheinlichkeit die Bruttoformel $C_{24}H_{32}O_5$ zukommt, wobei allerdings auf Grund der Verbrennungsergebnisse des Acetylderivates die wasserstoffreichere Formulierung $C_{24}H_{34}O_5$ nicht ganz ausgeschlossen werden konnte. Bei Acetylbestimmungen mit einem durch Chromatographie an Al_2O_3 gereinigten Präparat von Marinobufagin wurden praktisch keine flüchtigen Säuren (nur etwa 0,4%) erhalten, so dass das Vorliegen einer Acetyl- bzw. Propionyl⁴⁾-Gruppe im Marinobufagin mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte. Diese Resultate stellen eine Bestätigung der Befunde von *Deulofeu* & Mitarb.⁵⁾ dar. Demgegenüber gaben aber unsere Untersuchungen in bezug auf das Acetylprodukt des Marinobufagins ein von dem der argentinischen Autoren abweichendes Resultat: während diese etwa 18% flüchtige Säuren nach der *Kuhn-Roth*-Methode ermittelten, gab unser chromatographisch gereinigtes Präparat von Acetyl-marinobufagin nur etwa 9% flüchtige Säuren. Unsere Befunde machen also ein Mono-acetylderivat am wahrscheinlichsten und stimmten darin mit denjenigen von *Jensen*⁶⁾ überein,

¹⁾ 1. Mitt., *K. Meyer*, *Helv.* **35**, 2147 (1951).

²⁾ Auszug aus dem 2. Teil der Diss. *St. Pataki*, Basel 1954.

³⁾ 8. Mitt., *H. R. Urscheler*, *Ch. Tamm* & *T. Reichstein*, *Helv.* **38**, 883 (1955).

⁴⁾ *K. H. Slotta* & *K. Neisser*, *Mem. Inst. Butantan* (São Paulo) **11**, 89 (1937).

⁵⁾ *V. Deulofeu*, *E. Duprat* & *R. Labriola*, *Nature* **145**, 671 (1940).

⁶⁾ *H. Jensen*, *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 767 (1937).

während nach *Deulofeu* Mitarb. das Acetylprodukt des Marinobufagins als Di-acetylderivat zu formulieren wäre. Da die uns damals zur Verfügung stehenden Substanzmengen an diesem Bufogenin keine eingehenderen Untersuchungen erlaubten, mussten wir diese Unklarheit und noch andere Fragen bezüglich der Konstitution des Marinobufagins offen lassen.

Vor einiger Zeit kamen wir in den Besitz zweier grösserer Partien an getrocknetem Parotissekret der südamerikanischen Kröte *Bufo marinus* (L.) *Schneid.* Die eine wog 34 g und war von 97 Kröten durch Ausdrücken der Parotiden und einfaches Trocknenlassen an der Luft gewonnen worden¹⁾. Die Aufarbeitung (siehe experiment. Teil dieser Arbeit²⁾) gab rund 2,7 g Marinobufagin (ca. 8%) und rund 750 mg Telocinobufagin (ca. 2%). Somit lieferte jedes Tier im Durchschnitt etwa 350 mg Rohgift oder rund 28 mg Marinobufagin zw. 8 mg Telocinobufagin. Das andere Muster³⁾ wog 137 g und soll von etwa 1000 Kröten gewonnen worden sein. Es konnten daraus rund 13,3 g Marinobufagin (ca. 10%) und 3,7 g Telocinobufagin (ca. 2,5%) erhalten werden. Das Verhältnis Marinobufagin zu Telocinobufagin scheint somit recht konstant zu sein und beträgt 4:1. Ein weiteres Bufogenin konnte nicht aufgefunden werden, so dass, nach den bisherigen Untersuchungen zu schliessen, *Bufo marinus* nur 2 herzaktive Steroidgifte produziert.

Neue C-, H- und O-Bestimmungen mit dem frisch gewonnenen und sorgfältig durch Chromatographie an Al_2O_3 gereinigten Marinobufagin ergaben wiederum Werte, die am besten auf die Bruttoformel $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ passten. Ausserdem liessen sich nun auch mit dem Acetylderivat des neuen Marinobufagin-Präparates Verbrennungswerte erzielen, die mit dieser Formulierung in bestem Einklang standen⁴⁾. Marinobufagin muss deshalb – wenn es sich wirklich um ein Steroid

¹⁾ Herr Dr. *H. G. Kugler*, Trinidad, hatte die Freundlichkeit, dieses Gift eigenhändig zu gewinnen und entsprechend unseren Angaben zu trocknen und zum Versand zu bringen, wofür ihm auch hier nochmals bestens gedankt sei.

²⁾ Wir benützten für die Isolierung der Steroide aus dem Rohgift die rasch zum Ziele führende Methode von *Tschesche & Offe*⁵⁾. Das von *Reichstein* und Mitarb.⁶⁾ mit Erfolg zur Aufteilung des Parotissekretes von *Bufo bufo bufo* L. angewandte Verfahren (Verteilungsschromatographie) hat sich bei unserem Material als weniger günstig erwiesen.

³⁾ Herr Prof. *C. H. Hassall*, University College of the West Indies, Mona, St. Andrew, hat auf Veranlassung von Herrn Prof. *T. Reichstein* dieses Material für uns sammeln lassen. Wir danken den Genannten auch an dieser Stelle bestens für ihre Bemühungen in der Vermittlung dieses kostbaren Materials.

⁴⁾ Inzwischen haben *Reichstein* und Mitarb. (siehe die vorangegangene Mitteilung dieser Reihe) auch aus *Bufo bufo bufo* L. Marinobufagin isolieren können und die von diesen Autoren ermittelten C- und H-Werte des freien Bufogenins und seines Acetats lassen ebenfalls eindeutig erkennen, dass dem Marinobufagin die Formel $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ zukommen muss.

⁵⁾ *R. Tschesche & H. A. Offe*, Ber. deutsch. chem. Ges. **68**, 1998 (1935).

⁶⁾ 8. Mitt. dieser Reihe.

handelt, was auf Grund des Ergebnisses der Selendehydrierung¹⁾ anzunehmen ist – entweder eine Aldehydgruppe, eine Ketogruppe, eine Doppelbindung im Ringsystem, oder endlich eine O-Brücke enthalten. Eine Aldehyd- bzw. Ketogruppe lässt sich im UV. und auch im IR. nicht nachweisen, da das für diese Gruppierungen charakteristische Maximum mit der sehr ausgeprägten Absorptionsbande des α -Pyronringes zusammenfällt. Da aber Acetyl-marinobufagin mit CrO_3 in Eisessig nur wenig Säure gibt, was gelegentlich auch bei Dehydrierungsversuchen mit anderen Acetyl-bufogeninen, die keine Aldehydgruppe besitzen, schon beobachtet worden war²⁾, dürfte eine Aldehydgruppe im Marinobufagin nicht vorhanden sein. Aus den weiter unten beschriebenen Abbauprodukten geht ausserdem mit einiger Sicherheit hervor, dass auch eine Ketogruppe oder eine Doppelbindung im Ringsystem des Marinobufagins fehlt (siehe unter Acetoxysäure A (XII)). Die Bruttoformel $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ findet somit am ehesten durch die Annahme des Vorliegens eines Oxydringes eine einleuchtende und befriedigende Erklärung³⁾.

Für die Aufklärung der Konstitution der Bufogenine auf rein chemischem Weg hat sich vor allem der oxydative Abbau des Lactonringes mit KMnO_4 in Aceton bewährt⁴⁾. Dabei entstehen substituierte Ätiansäuren, die sich für die Abklärung der Funktion und Haftstelle der Sauerstoffatome am tetracyclischen Ringsystem als am geeignetsten erweisen. Beim Marinobufagin (bzw. seinem Acetylderivat) erwies sich diese Methode leider als wenig brauchbar, indem praktisch nur bei einem einzigen Oxydationsversuch eine einheitliche, kristallisierte Säure erhalten werden konnte, während alle weiteren Oxydationsansätze trotz Einhaltung gleicher Bedingungen zu uneinheitlichen amorphen Säuregemischen führten. Wir haben deshalb auf anderem Wege versucht, Funktion und Haftstelle der am Sterinskelett befindlichen O-Atome aufzuklären (siehe weiter unten).

Da wir bisher nicht in der Lage waren, diese Oxydationsversuche mit KMnO_4 wieder aufzunehmen und die dabei gebildeten Produkte eingehender zu analysieren, möchten wir im folgenden nur eine kurze Schilderung der bei dieser Abbaumethode gewonnenen vorläufigen Resultate geben.

Abbauversuche mit KMnO_4 .

Acetyl-marinobufagin (VI) gab mit KMnO_4 in Aceton⁵⁾ saure und neutrale Anteile. Die sauren Bestandteile liessen sich – vor allem

¹⁾ H. Jensen, J. Amer. chem. Soc. **59**, 767 (1937).

²⁾ K. Meyer, Helv. **35**, 2444 (1952).

³⁾ Herr Dr. H. M. E. Cardwell, Oxford, hat in einem Brief an uns vom 5. Juli 1954 dieselbe Vermutung ausgesprochen, obwohl auf Grund der von ihm aufgenommenen IR.-Spektren die Existenz eines Oxydrings nicht mit Sicherheit abgeleitet werden kann.

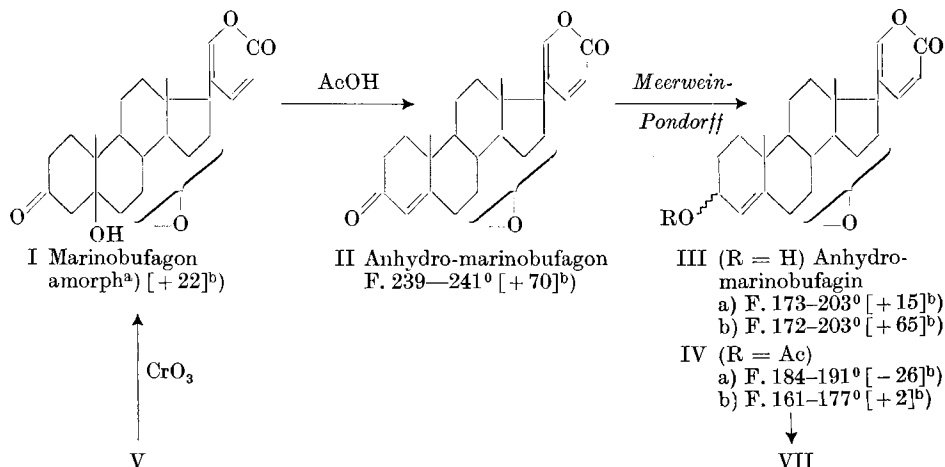
⁴⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1993 (1949) und frühere Mitteilungen.

⁵⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1238 (1949).

in einem Fall – in eine kristallisierte Acetoxysäure A (XII) und in eine amorphe Acetoxysäure B (XI) aufteilen. Die Neutralteile waren amorph. Sie dürften höchstens Spuren Ausgangsmaterial VI enthalten haben, denn im UV.-Licht konnte keine selektive Absorption zwischen 290–300 $m\mu$ (α -Pyronring) festgestellt werden. Ebenso wenig liess sich zwischen 350–355 $m\mu$ eine solche beobachten. Damit ist auch die Anwesenheit eines Lactons-(21 \rightarrow 14) der 20-Keto-pregnan-21-säure ausgeschlossen, das sich bisher immer¹⁾ aus den neutralen Anteilen der $KMnO_4$ -Oxydation von Acetyl-bufogeninen, die mit Sicherheit ein 14-ständiges Hydroxyl besitzen, isolieren liess. Dies ist sehr bedeutungsvoll; denn das Fehlen dieses Ketolactons in den Neutralprodukten der $KMnO_4$ -Oxydation ist ein wichtiges Indiz dafür, dass Marinobufagin überhaupt keine HO-Gruppe an C-14 trägt²⁾.

Kristallisierte Acetoxysäure A (XII).

Diese Säure gab, in wenig Chloroform gelöst, auf Zusatz von Tetranitromethan keine Gelbfärbung. Der mit ätherischem Diazomethan bereitete Acetoxysäure-A-methylester (XIII) liess sich in Kristallen gewinnen. Die Analysenwerte passten besser auf die wasserstoffreichere Formel $C_{23}H_{36}O_6$ als auf die Formel $C_{23}H_{34}O_6$, die auf Grund der Bruttoformel des Marinobufagins eigentlich zu erwarten war. Dieser Ester zeigt zwischen 220 und 360 $m\mu$ keine selektive Absorption (z. B. Ketogruppe), und das IR.-Spektrum³⁾ lässt lediglich

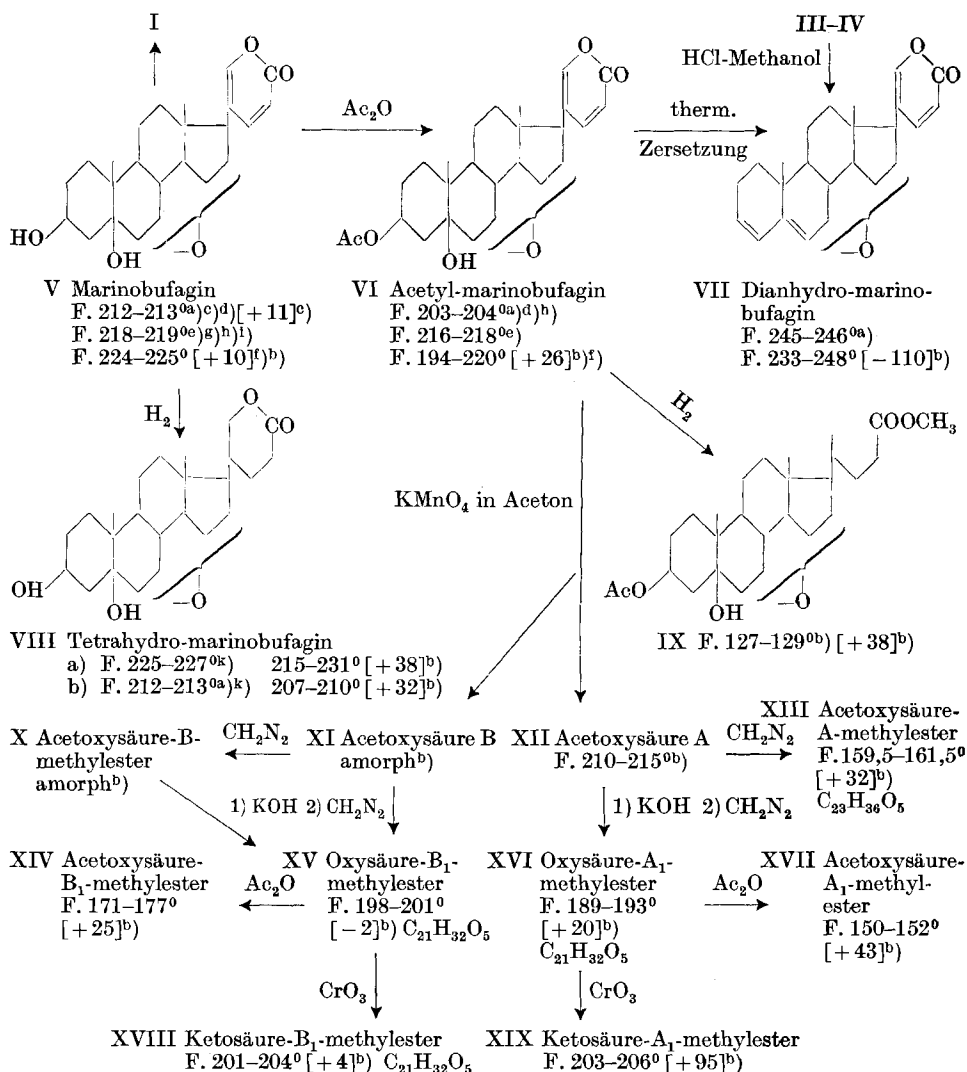


¹⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1993 (1949) und frühere Arbeiten.

²⁾ Die typische Bande bei ca. 355 $m\mu$ ($\log \epsilon = \text{ca. } 1,6$) ist erstmals von uns am Beispiel des Lactons der 3 β -Acetoxy-14-oxy-14-iso-20-keto-pregnan-21-säure⁴⁾ beobachtet worden (bisher unveröffentlicht). Inzwischen haben W. Schlegel, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. **38**, 1013 (1955) an anderen analog gebauten Lactonen diesen Befund bestätigen können.

³⁾ Herrn Dr. H. M. E. Cardwell, Oxford, sei auch hier bestens für die Aufnahme und Interpretation des IR.-Spektrums gedankt.

⁴⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1238 (1949).

a) H. Jensen & E. A. Evans, jr., J. biol. Chemistry **104**, 307 (1934).

b) Vgl. Exp. Teil dieser Arbeit.

c) J. J. Abel & D. I. Macht, J. Pharmacol. and Exp. Therap. **3**, 319 (1911–1912).d) H. Jensen & K. K. Chen, J. biol. Chemistry **87**, 755 (1930).e) V. Deulofeu & J. R. Mendive, Liebigs Ann. Chem. **534**, 288 (1938).f) K. Meyer, Helv. **34**, 2147 (1951).g) K. H. Slotta & K. Neisser, Mem. Inst. Butantan (São Paulo) **11**, 89 (1937).h) V. Deulofeu, E. Duprat & R. Labriola, Nature **145**, 671 (1940).i) R. Tschesche & H. A. Offe, Ber. deutsch. chem. Ges. **69**, 2361 (1936).k) H. Jensen, J. Amer. chem. Soc. **59**, 767 (1937).

das Vorhandensein von Estergruppen und einer HO-Gruppe erkennen; eine C=C-Bindung (6 μ -Region) kann ausgeschlossen werden.

Die Verseifung der Acetoxysäure A (XII) mit alkoholischem KOH ist mit einer Isomerisierung verbunden, wie die weiteren Umsetzungen des dabei erhaltenen Verseifungsproduktes zeigten. Dieses lieferte nach Methylierung mit Diazomethan den kristallisierten Oxysäure-A₁-methylester (XVI), der Formel C₂₁H₃₂O₅ (in Übereinstimmung mit C₂₄H₃₂O₅ für Marinobufagin). Der Ester zeigte zwischen 220 und 360 m μ keine selektive Absorption. Das IR.-Spektrum¹⁾ lässt ausser HO- und Estergruppen nichts Besonderes erkennen. Acetylierung des Oxyesters A₁ in Acetanhydrid-Pyridin gab den kristallisierten Acetoxysäure-A₁-methylester (XVII), der eindeutig verschieden war vom Acetoxysäure-A-methylester (XIII). – Dehydrierung des Oxysäure-A₁-methylesters (XVI) in CrO₃-Eisessig-Lösung lieferte den Ketoester XIX, über dessen Bruttoformel nichts Bestimmtes ausgesagt werden kann, da die Analysenergebnisse unter sich ausserordentlich stark divergierten. Dieses Dehydrierungsprodukt kann nicht einheitlich gewesen sein. Im UV. zeigte die Substanz nämlich zwei Maxima, das eine in der Region von 300 m μ (log ϵ = 1,12), was für das Vorliegen einer Keto-Gruppe spricht, das andere lag etwa bei 240 m μ (log ϵ = 1,6). Dieses kurzwelligere Maximum muss verursacht sein durch eine geringe Verunreinigung mit einem α,β -ungesättigten Keton. Dafür spricht auch das IR.-Spektrum, das in der Region von ca. 6 μ eine neue Bande zeigt, die für eine C=C-Bindung typisch ist¹⁾. Dass dieses Dehydrierungsprodukt XIX z. T. aus einem α,β -ungesättigten Keton bestand, wird durch die bei der Dehydrierung des Marinobufagins (siehe weiter unten) gemachten Befunde erhärtet.

Amorphe Acetoxysäure B (XI).

Methylierung der rohen amorphen Acetoxysäure B (XI) mit Diazomethan lieferte den Ester X, der auch nach chromatographischer Reinigung nicht in Kristallen gewonnen werden konnte. Die Verseifung des amorphen Acetoxysäure-B-methylester (X) mit alkoholischem KOH ist auch hier vermutlich von einer Isomerisierung begleitet (siehe weiter unten). Methylierung des rohen Verseifungsproduktes gab den kristallisierten Oxysäure-B₁-methylester (XV) der Formel C₂₁H₃₂O₅. Derselbe Ester liess sich auch durch analoge Verseifung und Remethylierung der amorphen Acetoxysäure B (XI) gewinnen. Die Absorptionskurve des Esters XV im UV. zeigt einen sehr charakteristischen Verlauf: das eigentliche Maximum liegt bei 292 m μ und log ϵ = 1,51, was für das Vorliegen einer Ketogruppe spricht. Die bei ca. 240 m μ sehr schwach ausgeprägte Schulter könnte durch die

¹⁾ Herrn Dr. H. M. E. Cardwell, Oxford, danken wir bestens für diese Aufnahme.

Anwesenheit eines α,β -ungesättigten Ketons verursacht sein. Die geringe Höhe der Extinktion spricht allerdings dafür, dass eine solche Verbindung nur in geringer Menge im Ester XV enthalten sein konnte. Das IR.-Spektrum¹⁾ lässt das Vorliegen einer HO-Gruppe und einer Carbonylgruppe erkennen. – Acetylierung des Oxyesters XV gab den Acetoxysäure-B₁-methylester (XIV), der zum Unterschied zum Acetoxysäure-B-methylester (X) in Kristallen gewonnen werden konnte. – Dehydrierung des Oxyesters B₁ (XV) mit CrO₃ in Eisessig lieferte das kristallisierte Produkt XVIII, das denselben Smp. wie der Oxyester B₁ (XV) zeigte, aber in der Mischprobe eine eindeutige Depression ergab. In bezug auf die spez. Drehung und das UV.-Absorptionsspektrum bestand praktisch Identität zwischen dem Dehydrierungsprodukt XVIII und dem Ausgangsester XV. Andererseits zeigte das IR.-Spektrum¹⁾ von XVIII aber gegenüber demjenigen des Esters XV eine ausgeprägte Verbreiterung der Carbonylbande (in der Region von 5,75–5,80 μ), die sich auch beim Übergang des Oxyesters XVI in sein Dehydrierungsprodukt XIX beobachten liess.

Hydrierungsversuche.

Da diese eben geschilderten Abbauprobeversuche einen ganz beträchtlichen Aufwand an Substanz erforderten und ausserdem in so unübersichtlicher Weise verliefen, versuchten wir auf anderen Wegen Einblick in die Konstitution des Marinobufagins zu gewinnen.

Für die Aufklärung des Stereoidanteils des Glykosids Scillaren A haben vor längerer Zeit schon Stoll & Mitarb.²⁾³⁾ durch reduktive Öffnung des α -Pyroneinges substituierte Cholanensäuren erhalten können, die durch weiteren Abbau in Allocholansäure²⁾ bzw. 3 β -Oxyallocholansäure übergeführt werden konnten. Diese Hydrierung des δ -Lactoneinges verläuft allerdings nicht einheitlich. Zur Hauptsache wurden dabei einfach die beiden Doppelbindungen im Lactoneing abgesättigt, und nur zum kleineren Teil geht der α -Pyroneing durch reduktive Öffnung in die Seitenkette der Gallensäuren über. Auch diese Methode erfordert recht beträchtliche Substanzmengen, weil für den weiteren Abbau nur die sauren Anteile der hydrierenden Spaltung verwendet werden können. Wir haben trotzdem solche Hydrierungsversuche unternommen, allerdings weniger in der Absicht, die dabei gebildeten Säuren weiter abzubauen, als vielmehr in der Erwartung, dass es gelingen könnte, eindeutige Beweise für den eingangs postulierten Oxydring im Marinobufagin zu finden.

Wie zu erwarten, gab Marinobufagin bei der Hydrierung mit PtO₂, H₂O in Eisessig zur Hauptsache neutrale Produkte. Daneben

¹⁾ Auch diese Aufnahme verdanken wir Herrn Dr. H. M. E. Cardwell, Oxford.

²⁾ A. Stoll, A. Hofmann & A. Helfenstein, Helv. **18**, 644 (1935).

³⁾ A. Stoll & J. Renz, Helv. **24**, 1380 (1941).

entstand ein Gemisch von Säuren, das nicht kristallisierte und aus dem auch nach Methylierung und chromatographischer Reinigung keine Kristalle gewonnen werden konnten. Dagegen gelang es, das Neutralprodukt in zwei Substanzen VIIIa und VIIIb aufzuteilen, die vermutlich identisch sind mit den beiden von *Jensen*¹⁾ als α - und β -Hexahydro-marinobufagin bezeichneten Hydrierungsprodukten. — Ein analog durchgeführter Hydrierungsversuch mit Acetyl-marinobufagin (VI) lieferte wieder in erster Linie Neutralstoffe, aus denen sich aber kein einheitliches Produkt gewinnen liess. Aus den sauren Anteilen konnte dagegen nach Methylierung der Ester IX einer Acetyl-marinobufaginsäure gewonnen werden. Das IR.-Spektrum²⁾ zeigte eine sehr scharfe Bande bei $2,82 \mu$, was für das Vorliegen einer einzigen tertiären HO-Gruppe an C-5 oder C-14 spricht. Wie später gezeigt wird (siehe weiter unten), besitzt Marinobufagin tatsächlich eine solche HO-Gruppe und zwar an C-5. Diese Bande bei $2,82 \mu$ ist also durch das ursprünglich schon vorhandene tertiäre Hydroxyl bedingt und nicht durch eine neue infolge reduktiver Öffnung eines Oxydringes entstandene HO-Gruppe. Bei $5,77 \mu$ findet sich ausserdem noch ein Extinktionsmaximum, das der Carbomethoxygruppe zukommt und die richtige Intensität zeigt, wie sie sich erfahrungsgemäss aus dem Zusammenwirken einer solchen Gruppe mit einer Acetoxgruppe ergibt. Da ausserdem im IR. jegliche Andeutung einer C=C-Bindung fehlt, die Formel dieses Acetyl-marinobufagin-säure-methylesters aber am besten auf $C_{27}H_{42}O_6$ passt (substituierter Acetoxycholansäure-methylester minus 2 H-Atome), scheint der im Marinobufagin vermutete Oxydring nicht geöffnet worden zu sein.

Dehydrierungsversuche mit Marinobufagin.

Marinobufagin gab, in Eisessig mit CrO_3 behandelt, ein amorphes Neutralprodukt, das nach chromatographischer Reinigung in zwei Substanzen aufgeteilt werden konnte. Die erste (II) war kristallin, die zweite amorph. Letztere dürfte das eigentliche Marinobufagon (I)³⁾ der Formel $C_{24}H_{30}O_5$ darstellen. Dieses zeigte im UV. mit Ausnahme des für den α -Pyronring typischen Maximums keine weitere Absorption. Die spezifische Drehung war etwas höher als die des Marinobufagins, was dem Übergang einer 3-ständigen HO-Gruppe in die CO-Gruppe bei anderen Steroiden entspricht. Das kristalline Dehydrierungsprodukt II aber zeigte eine sehr viel höhere spez. Drehung. Die Analysenwerte passten sehr gut auf die Formel $C_{24}H_{28}O_4$, liessen also

¹⁾ *H. Jensen*, J. Amer. chem. Soc. **59**, 767 (1937).

²⁾ Herrn Dr. *H. M. E. Cardwell*, Oxford, danken wir bestens für die Aufnahme dieses Spektrums sowie für dessen Interpretation.

³⁾ *H. Jensen & E. A. Evans, jr.*, J. biol. Chemistry **104**, 307 (1934), erhielten bei der Dehydrierung mit CrO_3 ebenfalls ein amorphes Produkt, das sie nicht näher untersuchten.

erkennen, dass die Dehydrierung von einer Wasserabspaltung begleitet war. Dieses Anhydro-marinobufagon (II) zeigte nun im UV. (siehe Fig. 1) 2 typische Maxima, das eine bei 294 $m\mu$, das andere bei 238 $m\mu$.

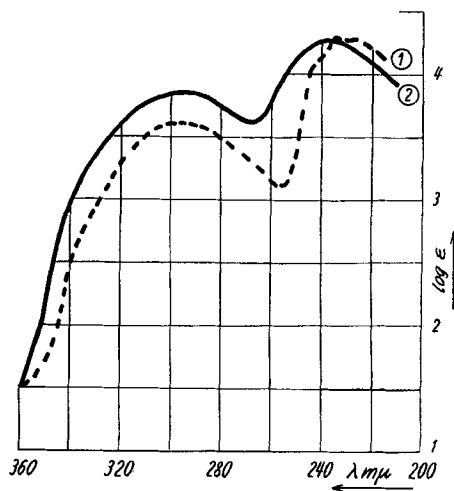


Fig. 1.

UV.-Absorptionsspektren in Alkohol¹⁾.

Kurve 1 = Dianhydro-marinobufagin (VII), Maxima bei 228 $m\mu$, $\log \epsilon = 4,29$; bei 235 $m\mu$, $\log \epsilon = 4,30$ und bei 300 $m\mu$, $\log \epsilon = 3,62$.

Kurve 2 = Anhydro-marinobufagon (II), Maxima bei 238 $m\mu$, $\log \epsilon = 4,28$ und bei 294 $m\mu$, $\log \epsilon = 3,85$.

Ersteres entspricht dem α -Pyronring, letzteres, dessen Intensität grösser ist, muss durch eine α,β -ungesättigte Carbonyl-Gruppe bedingt sein. Auch im IR.²⁾ lässt sich deutlich eine α,β -ungesättigte Ketogruppe erkennen. Ausserdem zeigt das Spektrum, dass keine weitere HO-Gruppe mehr in der Molekel enthalten sein kann. Die ausserordentlich grosse Ähnlichkeit des ungesättigten Ketons II mit Anhydro-telocinobufagon³⁾ oder Scillarenon⁴⁾ wird durch die Gegenüberstellung der IR.-Spektren dieser beiden Substanzen illustriert (siehe Fig. 2). – Das kristallisierte Anhydroprodukt II lässt sich auch durch einfaches Erhitzen des amorphen Marinobufagons (I) in Eisessig erhalten. Es war deshalb naheliegend anzunehmen, dass Marinobufagin ein 3,5-Dioxy-steroid ist, was sich durch die folgenden Befunde beweisen liess. Vergleicht man das im UV. kurzwelligere Maximum des Anhydro-marinobufagons mit dem analogen Maximum an-

¹⁾ Aufgenommen mit einem Beckman-Quartz-Spektrophotometer Modell DU.

²⁾ Herrn Dr. H. M. E. Cardwell, Oxford, danken wir bestens für die Aufnahme und Interpretation dieses Spektrums.

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

⁴⁾ A. Stoll, J. Renz & A. Brack, Helv. **34**, 2301 (1951).

derer α,β -ungesättigter Keto-steroiden, so ergibt sich aus der Lage (238 $m\mu$) und Intensität ($\log \epsilon = 4,28$) eine völlige Übereinstimmung mit den bei 3-Keto- Δ^4 -steroiden gefundenen Werten. Diese Tatsache

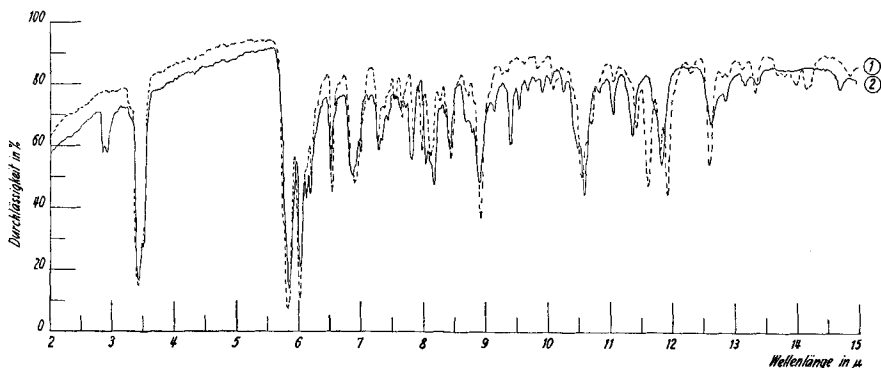


Fig. 2.

IR.-Absorptionsspektren in Nujol¹⁾.

Kurve 1 = Anhydro-marinobufagin (II). Kurve 2 = Scillarenon.

lässt sich durch einen weiteren spektroskopischen Vergleich erhärten: das Spektrum des 2,4-Dinitrophenylhydrazons des Anhydro-marinobufagons (siehe Fig. 3) deckt sich vollkommen mit demjenigen des Anhydro-telocinobufagons (Scillarenon), das, wie aus früheren Untersuchungen²⁾ hervorgeht, eindeutig eine 3-Keto- Δ^4 -Verbindung ist.

Dass Marinobufagin ein 3,5-Dioxy-steroid ist, müsste sich auch auf Grund der spezifischen Drehung seines Dianhydroderivates VII, das als ein $\Delta^{3:5}$ -Steroid zu formulieren ist, ableiten lassen. Dianhydro-marinobufagin ist schon von *Jensen & Evans*³⁾ aus Marinobufagin durch Erhitzen mit verd. H_2SO_4 in Äthanol bereitet worden, doch ist von diesen beiden Autoren die spez. Drehung nicht bestimmt worden. Dianhydro-marinobufagin lässt sich auch – allerdings in schlechter Ausbeute (5,5%) – aus Acetyl-marinobufagin durch thermische Zersetzung oder besser mittelst $POCl_3$ in Pyridin (24%) gewinnen. Der Vergleich der molekularen Drehungen von Steroiden mit verschiedenem konjugiertem Diensystem (siehe Tabelle 1⁴⁾) zeigt nun deutlich, dass es sich bei dem Dianhydro-marinobufagin (VII) wirklich um eine $\Delta^{3:5}$ -Verbindung handeln muss. Das UV.-Spektrum des Dianhy-

¹⁾ Aufgenommen durch Vermittlung von Herrn Dr. H. M. E. Cardwell, Oxford, mit einem *Perkin-Elmer*-Spektrophotometer.

²⁾ K. Meyer, *Helv.* **32**, 1593 (1949).

³⁾ H. Jensen & E. A. Evans, jr., *J. biol. Chemistry* **104**, 307 (1934).

⁴⁾ Die Tab. ist dem Buche von L. F. Fieser & M. Fieser, „Natural Products Related to Phenanthrene“, 3rd Edition 1949, Seite 210, entnommen und stützt sich auf die Arbeiten von D. H. R. Barton, *J. chem. Soc.* **1946**, 512.

droproduktes VII (siehe Fig. 1) zeigt neben dem charakteristischen Maximum bei ca. $300\text{ m}\mu$ (α -Pyronring) 2 Maxima bei 228 und $235\text{ m}\mu$, die für das $\Delta^{3:5}$ -System typisch sind¹⁾. Das IR.-Spektrum weist keine

Tabelle 1.
Molekulardrehungen in Chloroform.

| Dien | | $[\text{M}_D]$ |
|-------------------------|-------|----------------|
| 2:3 | 4:5 | + 531 |
| 3:4 | 5:6 | – 363 |
| 4:5 | 6:7 | – 75 |
| 5:6 | 7:8 | – 538 |
| 7:8 | 9:11 | + 27 |
| 7:8 | 14:15 | – 252 |
| 8:9 | 14:15 | – 152 |
| Dianhydro-marinobufagin | | – 400 |

HO-Bande mehr auf, zeigt aber eine stärkere Bande bei $8,8\text{ }\mu$ (Sauerstoffbrücke?).

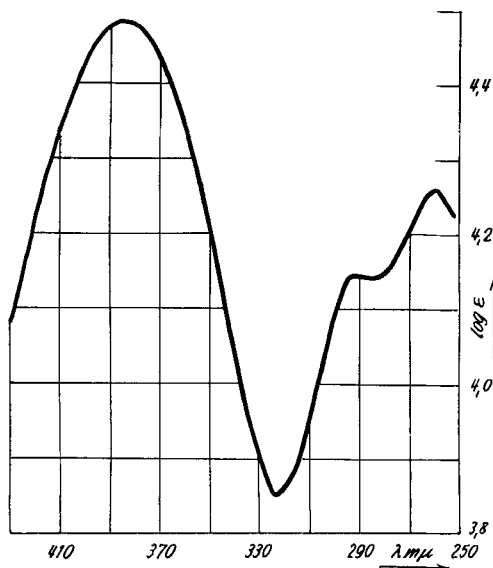


Fig. 3.

UV.-Absorptionsspektrum in Chloroform²⁾.

Anhydro-marinobufagon-2,4-dinitrophenylhydrazon, Maxima bei $260\text{ m}\mu$, $\log \varepsilon = 4,26$ und bei $388\text{ m}\mu$, $\log \varepsilon = 4,48$. Schulter bei $295\text{ m}\mu$, $\log \varepsilon = 4,16$.

¹⁾ Vgl. hierzu A. Stoll, J. Renz & A. Brack, Helv. **34**, 2305 (1951).

²⁾ Aufgenommen mit einem Beckman-Quartz-Spektrophotometer Modell DU.

Aus den obigen Befunden geht also eindeutig hervor, dass 2 O-Atome des Marinobufagins als HO-Gruppen vorliegen, die an C-3 und C-5 des Sterinskelettes zu placieren sind. Die Frage ihrer räumlichen Lage lässt sich wenigstens z. T. eindeutig durch Vergleich der spezifischen Drehungen von Marinobufagin und seinem Acetylderivat mit denjenigen der 4 möglichen 3,5-Dioxy-koprostane bzw. -cholestane und ihren Acetylderivaten beantworten, die alle bekannt sind¹⁾. Da Marinobufagin ein positives Acetylierungsinkrement besitzt, muss dieses Bufogenin dem Koprostantypus angehören, d. h. die HO-Gruppe an C-5 ist β -ständig angeordnet. In dieser Reihe besteht aber kein grosser Unterschied in bezug auf die Acetylierungsinkremente zwischen den an C-3 epimeren Verbindungen. In Analogie zu allen bisher in ihrer Konstitution eindeutig aufgeklärten Bufogeninen dürfte aber auch für Marinobufagin die β -Orientierung der 3-ständigen HO-Gruppe Gültigkeit haben. Dies lässt sich noch durch Vergleich des Acetylierungsinkrementes von Marinobufagin mit denjenigen nahe verwandter Steroide, bei denen die $3\beta,5\beta$ -Orientierung der HO-Gruppen eindeutig bewiesen ist, noch weiter erhärten (siehe Tab. 2)²⁾.

Tabelle 2.
Molekulardrehungen in Chloroform.

| | Genin | Monoacetat | Acetylierungs- inkrement |
|---------------------|---|---|-----------------------------|
| Strophanthidin . . | + 166 ³⁾ ⁴⁾ | + 250 ³⁾ ⁵⁾ | + 84 |
| Periplogenin . . . | + 123 ⁶⁾ ⁷⁾ ⁸⁾ | + 203 ⁵⁾ ⁷⁾ | + 80 |
| Telocinobufagin . . | + 20 ⁹⁾ | + 102 ⁹⁾ | + 82 |
| Hellebrigenin . . . | + 81 ¹⁰⁾ | + 165 ¹⁰⁾ , + 154 ¹¹⁾ | + 84, + 73 |
| Marinobufagin . . . | + 40 ¹²⁾ , + 32 ¹³⁾ | + 114 ¹²⁾ | + 82, + 74 |

¹⁾ Pl. A. Plattner, H. Heusser & A. B. Kulkarni, *Helv.* **31**, 1885 (1948).

²⁾ Anmerkung bei der Korrektur: Wir haben inzwischen noch das $3\beta,5\beta$ -Cyclo-carbodioxy-marinobufagin ($C_{25}H_{30}O_6$) herstellen können [Smp. 270—273°, $[\alpha]_D^{20} = + 22,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,7607$ in Chloroform); Ber. C 70,40 H 7,09%, Gef. C 70,44 H 7,31%]. Daraus folgt, dass auch die an C-3 befindliche HO-Gruppe β -ständig angeordnet ist.

³⁾ T. Reichstein & H. Rosenmund, *Pharmac. Acta Helv.* **15**, 150 (1940).

⁴⁾ H. Schwarz, A. Katz & T. Reichstein, *Pharmac. Acta Helv.* **21**, 250 (1946).

⁵⁾ P. Speiser, *Helv.* **32**, 1368 (1949).

⁶⁾ W. A. Jacobs & A. Hoffmann, *J. biol. Chemistry* **79**, 519 (1928).

⁷⁾ A. Katz & T. Reichstein, *Helv.* **28**, 476 (1945).

⁸⁾ A. Stoll & J. Renz, *Helv.* **22**, 1193 (1939).

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

¹⁰⁾ H. R. Urscheler, Ch. Tamm & T. Reichstein, *Helv.* **38**, 883 (1955).

¹¹⁾ J. Schmutz, *Helv.* **32**, 1442 (1949).

¹²⁾ K. Meyer, *Helv.* **34**, 2147 (1951).

¹³⁾ Wir fanden bei einer erneuten Bestimmung $[\alpha]_D^{18} = + 8,1^\circ \pm 1^\circ$ (in Chloroform); (Mittel aus 2 Bestimmungen).

Schliesslich haben wir versucht, die Gewinnung des oben erwähnten Dianhydro-marinobufagins (VII) ausgiebiger zu gestalten, da wir beabsichtigten, dieses für weitere Abbauprobungen zur Abklärung der Funktion des fünften O-Atoms heranzuziehen. Die Reaktionsfolge $V \rightarrow I \rightarrow II \rightarrow III \rightarrow VII$ gab aber nur zu 8% das gesuchte Dien, so dass auf Grund unserer Versuche in dieser Richtung die Umsetzung mit POCl_3 in Pyridin immer noch die ergiebigste ist.

Experimenteller Teil.

Alle Smp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze bis 200° ca. $\pm 2^\circ$, darüber ca. $\pm 3^\circ$. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Äther-Chloroform (4:1), Waschen mit 2-n. HCl (bei CrO_3 -Oxydationen mit 2-n. H_2SO_4), Wasser, 2-n. Sodalösung und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 , Filtrieren und Eindampfen. Substanzproben zur Bestimmung der spez. Drehung wurden jeweils 30 Min. bei 60° und 0,02 Torr, zur Analyse, wo nichts anderes vermerkt, 2 Std. bei 80° und 0,02 Torr über P_2O_5 getrocknet.

Gewinnung der Bufogenine aus dem getrockneten Parotissekret von *Bufo marinus* (L.) *Schneid.* 1. *Mit Hilfe der Verteilungschromatographie*^{1).} 5,4 g rohes, getrocknetes und fein gemahlenes Sekret wurde über einer Mischung von 700 g Hyflo Super Cel-Wasser (1:1) chromatographiert. (Dimensionen des Rohres 4,5 cm auf 90 cm, Durchflussgeschwindigkeit ca. 60 cm³ pro Stunde.) Petroläther und Petroläther-Benzol-Gemische bis zu einem Gehalt von 23% Benzol eluierten 46 mg Material. Aus Aceton-Äther Kristalle vom Smp. $140\text{--}153^\circ$ (γ -Sitosterin?). Die Fraktionen Petroläther-Benzol (mit 23–40% Benzol) eluierten 114 mg Material, das amorph blieb. Petroläther-Benzol-Gemische (mit 40–50% Benzol) eluierten 408 mg rohes Marinobufagin, woraus sich 300 mg Kristalle vom Smp. $216\text{--}220^\circ$ isolieren liessen. Aus den Fraktionen mit reinem Benzol konnten 235 mg Telocinobufagin vom Smp. $195\text{--}208^\circ$ gewonnen werden. Mit Chloroform konnten nur geringe Mengen amorpher Substanz, die nicht näher untersucht wurden, eluiert werden. Hingegen liess sich mit Butanol eine ganz beträchtliche Menge (ca. 20% des eingesetzten Rohgiftes) eines amorphen, stark dunkel gefärbten Produktes gewinnen, das bisher nicht untersucht wurde, weil es mit Sicherheit keine Bufogenine enthielt.

2. *Nach Tschesche & Offe*^{2).} Das zur Verfügung stehende Giftmaterial (rund 161 g) wurde im Mörser grob zerkleinert und hierauf mit dem gleichen Gewicht an trockenem Sand in einer Schlagmühle fein gemahlen. Das Gift-Sand-Gemisch wurde in Portionen (bis 120 g) im Soxhlet-Apparat mit neutralem Chloroform erschöpfend extrahiert. Die so gewonnenen, dunkelgelb gefärbten Chloroformauszüge wurden im Vakuum eingengt, mit verd. Sodalösung, mit verd. HCl und schliesslich mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Aus den Soda- bzw. HCl-Auszügen liessen sich 200 mg Säuren bzw. 120 mg Basen gewinnen, die nicht näher untersucht wurden. Im ganzen wurden aus 161 g Rohgift 36 g neutraler Rohextrakt gewonnen, der in Portionen an Al_2O_3 chromatographiert wurde. Die jeweiligen Eluate mit Benzol-Chloroform (1:4) und reinem Chloroform gaben 16,05 g (10% des trockenen Giftsekrets) rohes Marinobufagin. Durch Umkristallisieren aus Aceton-Äther liessen sich daraus 13,78 g Kristalle vom Smp. $223\text{--}225^\circ$ gewinnen; $[\alpha]_D^{20} = +10,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,4710$ in Methanol).

Zur Analyse wurde Marinobufagin im Achatmörser verrieben und 24 Std. im Hochvakuum bei 40° über P_2O_5 getrocknet und im Schweinchen eingewogen.

¹⁾ Vgl. H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein, *Helv.* **36**, 357 (1953).

²⁾ R. Tschesche & H. A. Offe, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **69**, 2361 (1936).

| | | | |
|-------------------|--------------|--------|---------------------------|
| $C_{24}H_{32}O_5$ | Ber. C 71,97 | H 8,05 | O 19,98% |
| (400,50) | Gef. „ 72,00 | „ 8,10 | „ 19,71% ¹⁾ 2) |

Chloroform-Methanol (49:1) eluierte 4,39 g (2,7%) rohes Telocinobufagin. Aus Aceton-Äther 2,26 g Kristalle vom Smp. 202—211°.

Acetyl-marinobufagin (VI). Marinobufagin wurde durch Stehenlassen während 20 Std. in Pyridin-Acetanhydrid bei 20° acetyliert. Das nach üblicher Aufarbeitung gewonnene rohe Acetat wurde an Al_2O_3 chromatographiert. Sämtliche Fraktionen des Chromatogramms lieferten Kristalle, die bei etwa 190—220° schmolzen. Sie wurden vereinigt; mehrmals aus Aceton-Äther umkristallisiert, gaben sie rhombische Prismen vom Smp. 195—220°.

Für die Analyse wurde das Acetylderivat im Achatmörser verrieben, 24 Std. im Hochvakuum bei 40° über P_2O_5 getrocknet und im Schweinchen eingewogen.

| | | | |
|----------------------------|--------------|--------|------------------------|
| $C_{26}H_{34}O_6$ (442,53) | Ber. C 70,56 | H 7,74 | O 21,69% |
| $C_{26}H_{36}O_6$ (444,54) | „ „ 70,24 | „ 8,16 | „ 21,60% |
| | Gef. „ 70,71 | „ 7,81 | „ 21,65% ³⁾ |

Oxydation des Acetyl-marinobufagin mit CrO_3 , 97 mg VI (Smp. 195 bis 218°) wurden in 2 cm³ Eisessig gelöst, mit 0,9 cm³ 2-proz. CrO_3 -Eisessig-Lösung (entspr. 1,2 O) und nach 3 Std. nochmals mit 0,45 cm³ derselben CrO_3 -Lösung versetzt. Nach weiteren 5 Std. war CrO_3 noch deutlich nachweisbar. Nun wurden einige Tropfen Methanol zugefügt und über Nacht stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 71 mg Neutrales und 16 mg saure Anteile. Letztere kristallisierten nicht. Das Neutralprodukt gab aus Aceton-Äther reines Acetylderivat VI vom Smp. 199—218°.

KMnO₄-Abbau des Acetyl-marinobufagin (VI). 500 mg VI vom Smp. 195—220° wurden in 40 cm³ Aceton⁴⁾ gelöst, mit 0,5 g fein gepulvertem KMnO₄ versetzt und bei Raumtemperatur auf der Maschine geschüttelt. Nach 20 Min. war alles KMnO₄ verbraucht. Nach Abdampfen des Acetons im Vakuum wurde der Rückstand im Mörser staubfein verrieben, mit verd. H_2SO_4 eben kongosauer gemacht und hierauf viermal mit 40 cm³ Chloroform extrahiert. Die Chloroformauszüge wurden jeweils einmal mit dest. Wasser gewaschen, im Vakuum eingeeengt und mit der 3fachen Menge (Volumen!) Äther versetzt. Diese Lösung wurde mit verd. Na_2CO_3 -Lösung erschöpfend ausgezogen. Die alkalischen Auszüge ergaben nach Versetzen mit verd. HCl und Extraktion mit reinem Chloroform 252 mg saure Anteile. Die mit Na_2CO_3 -Lösung erschöpfend ausgezogene Chloroform-Ätherlösung hinterliess nach Waschen mit H_2O , Trocknen über Na_2SO_4 , Filtrieren und Eindampfen 160 mg Neutralstoffe, die amorph blieben und mit den neutralen Anteilen weiterer Oxydationsversuche vereinigt und erneut dem Abbau mit KMnO₄ unterworfen wurden. — Die sauren Anteile wurden mit Aceton verflüssigt und gaben nach einiger Zeit körnige Kristalle vom Smp. 210—215° (Zers.). Es konnten im ganzen 126 mg kristallisierte Acetoxysäure A (XII) und 122 mg amorphe Acetoxysäure B (XI) gewonnen werden.

In weiteren analog durchgeführten Oxydationsansätzen liessen sich jeweils nur wenig oder gar keine Kristalle aus den sauren Anteilen gewinnen. Auch nach Aufteilung des KMnO₄ in mehrere kleinere Portionen, die in Intervallen von jeweils 5 Min. zugegeben wurden, konnten nur geringe Mengen der kristallisierten Acetoxysäure A (XII) erhalten werden: 500; 500; 1000 mg VI ergaben neben 82; 66; 0 mg krist. Säure XII jeweils 240; 216; 619 mg amorphe Säure XI und 73; 156; 292 mg Neutrales.

Auch die Nachoxydation der amorphen Säure XI mit KMnO₄ in Aceton oder mit CrO_3 in Eisessig oder mit 30-proz. H_2O_2 in Eisessig lieferte keine Kristalle der Säure A mehr.

¹⁾ J. Unterzaucher, Ber. deutsch. chem. Ges. **73**, 391 (1940); Mikrochem. **36/37**, 706 (1951).

²⁾ Diese Bestimmung wurde im mikroanalytischen Labor der Sandoz AG., Basel, ausgeführt, wofür auch an dieser Stelle Herrn Prof. A. Stoll bestens gedankt sei.

³⁾ Herrn Prof. A. Stoll sei auch hier bestens für diese Sauerstoffbestimmung gedankt.

⁴⁾ Gereinigt durch mehrstündiges Kochen über KMnO₄ und langsames Abdestillieren über frischem KMnO₄.

Acetoxysäure-A-methylester (XIII). 30 mg kristallisierte Acetoxysäure A wurden in einigen Tropfen Methanol gelöst, mit ätherischer Diazomethanolung versetzt und 10 Min. stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum wurde direkt an 1 g Al_2O_3 chromatographiert. Die Eluate mit Benzol gaben 27 mg Rohprodukt vom Smp. 154–160°. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther konnten 14 mg des reinen Esters XIII vom Smp. 159,5–161,5° erhalten werden; $[\alpha]_D^{17} = +31,8^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,5967$ in Chloroform).

$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_6$ (406,50) Ber. C 67,95 H 8,43%

$\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_6$ (408,52) Ber. „ 67,61 „ 8,88% Gef. C 67,60 H 8,73%

Das IR.-Spektrum zeigt bei 2,82 μ und 5,76 μ Absorptionsbanden, ([tertiäre] HO-Gruppe, Acetoxy- bzw. Carbomethoxy-Gruppe).

Oxysäure-A₁-methylester (XVI). 285 mg Acetoxysäure A (XII) wurden in 10 cm³ Methanol mit 1,5 cm³ 25-proz. KOH-Lösung versetzt und 40 Std. bei 35° stehengelassen. Nach Aufarbeitung und Methylierung wurden 250 mg Rohprodukt erhalten, das an 8 g Al_2O_3 chromatographiert wurde. Die Fraktionen mit reinem Chloroform bis Chloroform-Methanol (49:1) lieferten 167 mg Oxysäure-A₁-methylester (XVI) vom Smp. 178–190° und 57 mg Mutterlauge. 2maliges Umkristallisieren aus Aceton-Äther gab prism. Platten vom Smp. 189–193° (Tröpfchenbildung ab 180°); $[\alpha]_D^{18} = +19,9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,2571$ in Chloroform).

$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (364,47) Ber. C 69,20 H 8,85% Gef. C 69,22 H 9,13%

Das UV.-Absorptionsspektrum zeigt nichts. Das IR.-Spektrum weist eine breite Bande bei 3,08 μ (HO-Gruppen) und eine solche bei 5,73 μ (Estergruppe) auf. Eine –C=C-Gruppierung ist nicht sichtbar.

Acetoxysäure-A₁-methylester (XVII). 20 mg Oxysäure-A₁-methylester (XVI) vom Smp. 189–193° wurden wie üblich in Acetanhydrid-Pyridin acetyliert und aufgearbeitet. Aus Aceton-Äther Kristalle vom Smp. 150–152°; $[\alpha]_D^{18} = +42,6^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,2110$ in Chloroform).

$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_6$ (406,50) Ber. C 67,95 H 8,43% Gef. C 62,01 H 8,13%

Ketosäure-A₁-methylester (XIX). 100 mg Oxysäure-A₁-methylester (XVI) vom Smp. 178–190° wurden in 2 cm³ Eisessig gelöst, mit 2 cm³ 2-proz. CrO_3 -Eisessig-Lösung versetzt und bei 20° stehengelassen. Nach 2 Std. war kein CrO_3 mehr nachweisbar. Ein weiterer Zusatz von 1,0 cm³ 2-proz. CrO_3 -Eisessig-Lösung war nach 3 Std. verbraucht. Nach nochmaligem Zufügen von 1 cm³ dieser CrO_3 -Lösung konnte nach weiteren 3 Std. noch CrO_3 nachgewiesen werden. Nun wurde mit einigen Tropfen Methanol versetzt, über Nacht stehengelassen und hierauf wie üblich aufgearbeitet. Es resultierten 80 mg Rohprodukt, das aus Aceton-Äther in Nadeln und Platten kristallisierte. Smp. 203–206° (Tröpfchenbildung ab 188°); $[\alpha]_D^{18} = +95,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,6940$ in Chloroform).

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (362,45) Ber. C 69,58 H 8,34%

Gef. „ 65,64 „ 8,03% Gef. C 71,92 H 8,19% (ETH)

Das UV.-Absorptionsspektrum zeigt ein Maximum bei 295 m μ und $\log \epsilon = 1,12$ (in Äthanol). Das IR.-Spektrum weist Banden auf bei 2,94 μ und 3,04 μ (HO-Gruppen); 5,76 μ und 5,97 μ (Carbonyl-Gruppen); 6,05 μ (C=C-Doppelbindung).

Acetoxysäure-B-methylester (X). 652 mg amorphe Acetoxysäure B (XI) wurden in Methanol mit überschüssigem ätherischem Diazomethan methyliert. Aus dem rohen Ester liessen sich auch nach chromatographischer Aufteilung über Al_2O_3 keine Kristalle gewinnen.

Oxysäure-B₁-methylester (XV). 520 mg amorphe Acetoxysäure B (XI) wurden in 10 cm³ Methanol gelöst und mit 3,3 cm³ 25-proz. KOH-Lösung 45 Std. bei 35° stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung und anschliessender Methylierung mit Diazomethan wurden 460 mg Rohprodukt erhalten, die nach chromatographischer Aufteilung an Al_2O_3 140 mg Kristalle vom Smp. 180–197° gaben. Nach dreimaligem Umlösen aus Aceton-Äther stieg der Smp. des in Nadeln kristallisierenden Oxyesters B₁ XV auf 198–201° (Tröpfchenbildung ab 182°). Das übrige Material der obigen Chromatographie blieb amorph.

500 mg amorpher Acetoxysäure-B-methylester (X) gaben nach analoger Verseifung und Methylierung, gefolgt von chromatographischer Reinigung des rohen Methylesters, 115 mg Ester XV, der nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther ebenfalls bei 198–201° schmolz. Die Mischprobe gab keine Depression; $[\alpha]_D^{18} = -1,70 \pm 3^\circ$; $-3,70 \pm 3^\circ$ ($c = 0,5706$ bzw. $0,5312$ in Chloroform).

$C_{21}H_{32}O_5$ (364,47) Ber. C 69,20 H 8,85% Gef. C 69,15 H 8,85%

Das UV.-Absorptionsspektrum (in Alkohol) weist bei 292 $m\mu$ und $\log \epsilon = 1,51$ ein Maximum auf. Das IR.-Spektrum zeigt zwei Banden bei 3,03 μ (Hydroxyl) und 5,78 μ (Carbonyl).

Acetoxysäure-B₁-methylester (XIV). 15 mg Oxsäure-B₁-methylester (XV) vom Smp. 175–194° wurden im Hochvakuum bei 50° getrocknet, in 0,3 cm³ abs. Pyridin gelöst, mit 0,2 cm³ Acetanhydrid versetzt und 42 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 16 mg Rohprodukt. Aus Äther-Petroläther Kristalle vom Smp. 171–177°; $[\alpha]_D^{18} = +24,80 \pm 3^\circ$ ($c = 0,4420$ in Chloroform).

Der weiter oben beschriebene und durch Chromatographie gereinigte amorphe Acetoxysäure-B-methylester (X) wurde in Äther-Petroläther mit diesem Ester XIV angeimpft, kristallisierte aber nicht.

Ketosäure-B₁-methylester (XVIII). 200 mg Oxsäure-B₁-methylester (XV) vom Smp. 182–195° wurden in 2 cm³ Eisessig gelöst, mit 1 cm³ 5-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung versetzt, die nach 2½ Std. verbraucht war. Nach Zugabe von 0,5 cm³ 5-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung konnte noch nach 5 Std. CrO₃ nachgewiesen werden. Nach dieser Zeit wurde mit einigen Tropfen Methanol versetzt, über Nacht stehengelassen und hierauf wie üblich aufgearbeitet. Das Rohprodukt (174 mg) kristallisierte aus Aceton-Äther teilweise (55 mg). Die Kristalle zeigten einen Smp. von 201–203° (Tröpfchenbildung ab 185°). Die Mischprobe mit dem Oxyester XV vom Smp. 198–201° schmolz bei 170–198°. Auch mit dem Ketoester XIX vom Smp. 203–206° wurde eine Smp.-Erniedrigung erhalten (194–199°). $[\alpha]_D^{17} = +4,00 \pm 3^\circ$ ($c = 0,7479$ in Chloroform).

$C_{21}H_{30}O_5$ (362,45) Ber. C 69,58 H 8,34%

$C_{21}H_{32}O_5$ (364,46) „ „ 69,20 „ 8,85% Gef. C 69,12 H 8,56%

UV.-Absorptionsspektrum: $\lambda_{\max} = 282-283 m\mu$; $\log \epsilon = 1,61$ (Schulter bei ca. 235 $m\mu$; $\log \epsilon = 2,2$) (in Äthanol). IR.-Spektrum: 2,90 μ (Hydroxyl), 5,78 μ , 5,87 μ (Carbonyl).

Tetrahydro-marinobufagin VIIIa und VIIIb. 204 mg Marinobufagin vom Smp. 219–224° wurden in 6 cm³ Eisessig mit 26 mg PtO₂·H₂O bei 15° hydriert. Das Rohprodukt gab nach üblicher Aufarbeitung 123 mg Neutrales und 80 mg Säuren. Die Neutralteile wurden an 4 g Al₂O₃ chromatographiert. Die Eluate mit Chloroform lieferten 45 mg Tetrahydro-marinobufagin VIIIa in Lamellen vom Smp. 207–229°, die aus Aceton-Äther noch zweimal umkristallisiert wurden. Smp. 215–231°; $[\alpha]_D^{18} = +37,80 \pm 2^\circ$ ($c = 0,9781$ in Chloroform).

Aus den Fraktionen mit Chloroform-Methanol (49:1 bis 19:1) liessen sich 68 mg Kristalle = Tetrahydro-marinobufagin VIIIb vom Smp. 199–205° gewinnen, die in Aceton leichter löslich waren als VIIIa. Nach zweimaligem Umkristallisieren stieg der Smp. auf 207–210°; $[\alpha]_D^{18} = +31,80 \pm 3^\circ$ ($c = 0,5345$ in Chloroform).

Die sauren Anteile der obigen Hydrierung blieben amorph. Sie wurden mit ätherischem Diazomethan methyliert und das erhaltene Gemisch der Methylester chromatographisch aufgeteilt. Es konnten aus keiner Fraktion Kristalle erhalten werden.

Acetyl-marinobufaginsäure-methylester (IX). 446 mg Acetyl-marino-bufagin (VI) vom Smp. 195–220° wurden in 9 cm³ Eisessig mit 29 mg PtO₂·H₂O bei 17° hydriert. Das rohe Hydrierungsprodukt liess sich in 247 mg neutrale und 195 mg saure Anteile aufteilen. Die Neutralprodukte wurden an 8 g Al₂O₃ chromatographiert. Aus den ersten Fraktionen mit Benzol-Chloroform (2:3) und (1:4) liessen sich keine einheitlichen Kristallisate gewinnen. Die letzten Fraktionen mit Benzol-Chloroform (1:4) ergaben eine

scheinbar einheitliche Substanz (20 mg) vom Smp. 173–176°; $[\alpha]_D^{16} = +26,9^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,4077$ in Chloroform).

Die späteren Eluate mit Chloroform und Chloroform-Methanol gaben uneinheitliche Kristallisate oder nur amorphes Material.

Die sauren Anteile wurden mit überschüssigem ätherischem Diazomethan methyliert und an Al_2O_3 chromatographiert. Petroläther-Benzol (1:1) bis (3:7) gab 41 mg Acetylmarinobufaginsäure-methylester (IX) vom Smp. 127–129° (aus Äther-Petroläther); $[\alpha]_D^{16} = +38,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,8827$ in Chloroform).

$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_6$ (462,61) Ber. C 70,10 H 9,15% Gef. C 70,06 H 9,31%

IR.-Spektrum: sehr ausgeprägte Bande bei 2,82 μ (tertiäres HO), scharfe Bande bei 5,77 μ (Estergruppe).

Die späteren Eluate gaben teils uneinheitliche Kristallisate teils amorphes Material.

Dehydrierung von Marinobufagin mit CrO_3 . 227 mg Marinobufagin (V) vom Smp. 219–224° wurden in 4 cm³ Eisessig gelöst und mit 2 cm³ 2-proz. CrO_3 -Eisessig-Lösung bei 20° stehengelassen. Nach 2 Std. war kein CrO_3 mehr nachweisbar. Ein weiterer Zusatz von 1 cm³ CrO_3 -Lösung war nach 2 Std. ebenfalls verbraucht. Nach nochmaligem Zufügen von 0,5 cm³ CrO_3 -Lösung konnte nach weiteren 2 Std. noch CrO_3 nachgewiesen werden. Nun wurde mit einigen Tropfen Methanol versetzt, 15 Std. stehengelassen und hierauf wie üblich aufgearbeitet. Das rohe Dehydrierungsprodukt (220 mg) wurde an 7 g Al_2O_3 chromatographisch aufgeteilt. Benzol-Chloroform (3:2) bis (1:4) eluierten 59 mg kristallisiertes Material, das den Rohsmp. 230–240° zeigte. Die Fraktionen mit reinem Chloroform hinterliessen nach dem Eindampfen ein farbloses Öl.

Marinobufagin (I). Das ölige Material aus obiger Chromatographie liess sich nicht kristallisieren; $[\alpha]_D^{19} = +22,2^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,6739$ in Chloroform).

UV.-Absorptionsspektrum $\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 3,70$ (in Äthanol).

Anhydro-marinobufagin (II). Die Rohkristalle vom Smp. 230–240° aus obigem Chromatogramm wurden aus Aceton-Äther umkristallisiert und gaben Plättchen vom Smp. 239–241°; $[\alpha]_D^{17} = +70,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0707$ in Chloroform).

$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$ (380,46) Ber. C 75,76 H 7,42% Gef. C 75,73 H 7,46%

UV.-Absorptionsspektrum $\lambda_{\text{max}} = 238 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,28$; $\lambda_{\text{max}} = 294 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,85$ (Äthanol). IR.-Spektrum: 5,83 μ (Carbonyl), 6,01 μ , 6,20 μ , 6,53 μ (Doppelbindung), 8,5 μ (Oxyd-Ring?).

Anhydro-marinobufagin (II) lässt sich aus dem amorphen Marinobufagin (I) durch kurzes Erhitzen (10 Min.) in Eisessig auf 125° gewinnen. Es liessen sich in einem Fall aus 160 mg Rohprodukt (nach anschliessender chromatographischer Aufteilung) 126 mg Kristalle von II gewinnen.

Anhydro-marinobufagin-2,4-dinitrophenylhydrazon. 100 mg Anhydro-marinobufagin (II) (Kristalle und krist. Mutterlaugen) wurden mit 120 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 5,5 cm³ Äthanol, das 1 cm³ Eisessig enthielt, 5 Min. am Rückfluss erhitzt. Nach Verdampfen des Alkohols im Vakuum wurde direkt über 7 g Al_2O_3 chromatographiert. Benzol-Chloroform (9:1 bis 3:1) gab 45 mg rohes Hydrazon vom Smp. 179–190°. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Chloroform-Äthanol (1:10) stieg der Smp. auf 189–192° (Zers.).

$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_7\text{N}_4$ Ber. C 64,27 H 5,75 N 9,99%
(560,59) Gef. „ 64,00 „ 5,82 „ 9,92%

UV.-Absorptionsspektrum: $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,26$; Schulter = 290 $\text{m}\mu$, $\log \epsilon = 4,14$; $\lambda_{\text{max}} = 385 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,48$ (in Chloroform).

Anhydro-telocinobufagin-2,4-dinitrophenylhydrazon. 70 mg Anhydro-telocinobufagin¹⁾ vom Smp. 225–255° wurden wie oben mit 105 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt. Nach chromatographischer Reinigung wurden 53 mg rohes krist.

¹⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1593 (1949); vgl. auch A. Stoll, J. Renz & A. Brack, ibid. **34**, 2301 (1951).

Hydrazon vom Smp. 246–256° erhalten. Umlösen aus Chloroform-Äthanol (1:10) liess den Smp. auf 252–255° (Zers.) ansteigen. UV.-Absorptionsspektrum: $\lambda_{\max} = 260 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,26$; Schulter = 295 $\text{m}\mu$, $\log \epsilon = 4,16$; $\lambda_{\max} = 388 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,48$ (in Chloroform).

Δ^4 -Anhydro-marinobufagin (IIIa und IIIb). 368 mg Anhydro-marino-bufagon (II) vom Smp. 236–239° wurden 1 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet, hierauf in 130 cm^3 abs. Isopropanol mit ca. 3 g Aluminiumisopropylat unter Feuchtigkeits-ausschluss in der Weise gekocht, dass in 7 Std. etwa 35 cm^3 Isopropanol-Aceton abdestillierten. Dann wurde im Vakuum eingengt, mit verd. H_2SO_4 versetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit verd. H_2SO_4 und Wasser gewaschene Chloroformlösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und eingedampft. Es resultierten 370 mg Rohprodukt, das an 12 g Al_2O_3 chromatographiert wurde. Die Eluate mit Benzol und Benzol-Chloroform (4:1) lieferten 236 mg Kristalle, die nach zweimaligem Umlösen aus Aceton-Äther Nadeln vom Smp. 173–203° gaben (IIIa); $[\alpha]_{\text{D}}^{19} = +14,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,4114$ in Chloroform).

UV.-Absorptionsspektrum: $\lambda_{\max} = 300 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,72$ (in Äthanol).

Die Fraktionen mit Benzol-Chloroform (4:1) bis zu reinem Chloroform gaben 83 mg Kristalle, die aus Aceton-Äther Körner vom Smp. 172–203° lieferten (IIIb). Die Mischprobe mit dem obigen Material vom Smp. 173–203° schmolz bei 171–203°; $[\alpha]_{\text{D}}^{19} = +64,9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,3234$ in Chloroform).

UV.-Absorptionsspektrum: $\lambda_{\max} = 300 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 3,72$ (in Äthanol).

Acetylierung der beiden Δ^4 -Anhydro-marinobufagine. 46 mg IIIa vom Smp. 173–203° wurden 1 Std. bei 50° im Hochvakuum getrocknet und anschliessend in Pyridin-Acetanhydrid durch Stehen bei 20° während 48 Std. acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung wurde an 1,5 g Al_2O_3 chromatographiert. Benzol bis Benzol-Chloroform (3:2) gaben 37 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther Kristalle vom Smp. 184–191° (IVa) (Sintern ab 162°); $[\alpha]_{\text{D}}^{17} = -26,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0735$ in Chloroform).

31 mg IIIb vom Smp. 163–200° wurden wie oben acetyliert und aufgearbeitet. Das Rohprodukt lieferte nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther Kristalle vom Smp. 161–177° (IVb); $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +2,2^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,2246$ in Chloroform).

Dianhydro-marinobufagin (VII). 1. Aus Δ^4 -Anhydro-marinobufagin (IIIa). 167 mg IIIa (Kristalle und Mutterlaugen) wurden in 20 cm^3 Methanol gelöst und mit 15 cm^3 2-proz. HCl-Methanol 24 Std. bei 35° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 150 mg Rohprodukt, das an 4 g Al_2O_3 chromatographiert wurde. Aus den mit Benzol-Chloroform (4:1) erhaltenen Eluatzen wurden 65 mg Dianhydro-Verbindung isoliert. Diese wurden dreimal aus Aceton-Äther umkristallisiert und gaben 25 mg (15%) etwas gelbstichiger Kristalle vom Smp. 233–248°; $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -110,1^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,3450$ in Chloroform).

$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_3$ (364,46) Ber. C 79,08 H 7,74% Gef. C 78,82 H 8,12%

UV.-Absorptionsspektrum: $\lambda_{\max} = 228 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,29$; $\lambda_{\max} = 235 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,30$; $\lambda_{\max} = 300 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,62$ (in Äthanol).

2. Aus Acetyl-marinobufagin (VI) durch thermische Zersetzung. 113 mg VI vom Smp. 195–219° wurden im Molekularkolben 2 Std. auf 190–210° (Badtemperatur) und 0,02 Torr erhitzt. Das Sublimat (57 mg) wurde über 2 g Al_2O_3 chromatographiert und gab 5 mg reines Dianhydro-marinobufagin (VII) vom Smp. 226–240°. Aus dem im Molekularkolben verbliebenen gelb gefärbten Rückstand liessen sich auch nach chromatographischer Reinigung keine Kristalle gewinnen.

3. Aus Acetyl-marinobufagin (VI) durch POCl_3 . 70 mg VI vom Smp. 195–219° wurden in 3 cm^3 abs. Pyridin gelöst und mit 0,7 cm^3 POCl_3 24 Std. bei a mtemperatur stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 54 mg Rohprodukt erhalten, aus dem nach Chromatographie an Al_2O_3 14 mg Dianhydro-Verbindung VII vom Smp. 224–250° isoliert werden konnten.

Die Analysen wurden, wenn nichts anderes vermerkt, im Mikrochemischen Laboratorium der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel (Leitung E. Thommen) ausgeführt.

SUMMARY.

Marinobufagin, which has the formula $C_{24}H_{32}O_5$, is a 3,5-dihydroxysteroid on the basis of chemical evidence. β -Orientation of the C-5 HO-group can be deduced from molecular rotation differences between Marinobufagin and some of its derivatives. The spatial arrangement of the HO-group at C-3 is most probably the same¹). Marinobufagin contains no tertiary hydroxyl at C-14 and the fifth oxygen-atom of this genin must be located in an oxide-ring of unknown size, about which no precise statements can be made.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

197. Über die katalytische Reduktion aliphatischer Carbonsäureamide

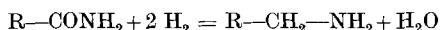
von A. Guyer, A. Bieler und G. Gerliczy.

(14. IX. 55.)

Nebst der Überführung aliphatischer Carbonsäureamide in die entsprechenden Alkylamine auf dem Weg über die Nitrile



ist auch die direkte katalytische Reduktion versucht worden:



H. Adkins und Mitarbeiter haben in ihre Versuche zur katalytischen Reduktion von Carbonsäuren und ihren Derivaten mit Hilfe von Kupfer-Chrom-Oxyd als Katalysator auch die Carbonsäureamide einbezogen. Es zeigte sich dabei, dass für die Reduktion der Amide extremere Bedingungen anzuwenden sind als für die übrigen Säurederivate. *H. Adkins & B. Wojcik*²⁾ glaubten bei der Hochdruckreduktion verschiedener Monocarbonsäureamide mit Anwendung einer Suspension von Kupfer-Chrom-Oxyd in Dioxan Ausbeuten bis zu 40–70 % an primären und 25–60 % an sekundären Aminen erhalten zu haben. Diese Zahlen wurden indessen nach neueren Untersuchungen von *H. J. Schneider, H. Adkins & S. M. McElwain*³⁾ dahin berichtigt, dass z. B. aus Laurinsäureamid neben viel Laurylalkohol nur 35–70 % Amine, und zwar vorwiegend sekundäres neben wenig primärem Amin, erhalten werden. Auch *S. Ueno & S. Takase*⁴⁾ erhielten bei Anwendung von Kupfer-Chrom-Oxyd aus höhermolekularen Monocarbon-

¹⁾ See footnote 2, page 1642 of this communication.

²⁾ *H. Adkins & B. Wojcik*, J. Amer. chem. Soc. **56**, 247, 2419 (1934).

³⁾ *H. J. Schneider, H. Adkins & S. M. McElwain*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 4287 (1952).

⁴⁾ *S. Ueno & S. Takase*, J. Soc. chem. Ind., Japan, **42**, Suppl. binding, 409 (1939); **44**, Suppl. binding, 29 (1941).