試料を供試戴き成分々析をして戴いた田口平八郎氏に深謝します。

津村研究所

〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
84 (1) 77 ~ 81

UDC 547.993.3.02

14. 小松曼著：蟾酥の成分(第22報^{*1}) アンヒドロガマブホタリンの構造について

Manki Komatsu: Studies on the Components of Toad Venom. XXII.
On the Structure of Anhydrogamabufotalins.

(Research Laboratory, Taishio Pharmaceutical Co., Ltd.*2)

The two anhydro isomers, m.p. 204° and 259~261°, formed by heating gamabufotalin with alcoholic hydrochloric acid or with sulfuric acid were examined by measurement of their infrared, ultraviolet, and NMR spectra, and optical rotation. These examinations confirmed that the former is Δ^{14} -anhydrogamabufotalin and the latter, $\Delta^{8(14)}$ -anhydrogamabufotalin.

(Received June 18, 1963)

gamabufotalin (I) をエタノール性塩酸または硫酸と熱することにより, m.p. 204° と m.p. 259~261° のアンヒドロ異性体を生成することが知られているが¹⁾ 両者の構造はまだ決定されていない。

Chart 1.

*1 第21報：本誌，81，1345 (1961)。

*2 Takataminami-cho, Toshima-ku, Tokyo.

1) H. Wieland, F. Vocke: Ann., 481, 215 (1930); 近藤，大野：本誌，59，531 (1939)。

著者はブホゲニンの構造と生理作用の関係を検討する過程において、両異性体の構造研究を行ない、その IR, NMR, UV スペクトル, $[\alpha]_D$ などの測定結果から, m.p. 204° の異性体は Δ^{14} -anhydrogamabufotalin (II) であり, m.p. 259~261° のものは $\Delta^{8(14)}$ -anhydrogamabufotalin (III) であることを確認したので報告する。

すなわち, gamabufotalin (I) の酸脱水反応により生成する二つのアンヒドロ体 (II) および (III) の *p*-nitrobenzoate はともに無晶物ではあるが, 窒素の元素分析の結果 bis(*p*-nitrobenzoate) を与え, その IR スペクトルは 2.74~2.79 μ に OH の吸収を全く示さない。したがって両アンヒドロ体は 3 β -, 11 α -OH (3 β , 11 α -bis(*p*-nitrobenzoate) を与える) を有し, 14 β -OH のみ離脱したものである。この両アンヒドロ体は薄層クロマトグラフィおよび Zaffaroni-system による濾紙クロマトグラフィで分離しない。

14 β -OH の離脱により Δ^{14} および $\Delta^{8(14)}$ アンヒドロ体の生成が考えられるが, 一般に二つのリングにまたが

Fig. 1. Ultraviolet Absorption Spectra of Δ^{14} - and $\Delta^{8(14)}$ -Anhydrogamabufotalin (II, III) in Methanol (EPS-2U, Hitachi)

II : 203 m μ (log ϵ 3.95)

III : 205 m μ (log ϵ 4.20)

る 4 置換の exocyclic double bond $\text{C}>\text{C}=\text{C}<\text{C}$ の $\Delta^{8(14)}$ は短波長域の UV スペクトルにおいて, 3 置換二重結合 $\text{C}>\text{C}=\text{C}<\text{H}$ の Δ^{14} より少し高い吸収を示すようである。²⁾ II, III のような bufadienolide では側鎖不飽和ラクトンの影響が考えられるが, 測定結果は Fig. 1 のごとく III が II より高い吸収を示した。またこの不飽和ラクトンの影響を除くために両アンヒドロ体を接触還元し,^{*3} その中性物^{*4} について UV スペクトルを測定したところ, II の還元物 (VI) はほとんど吸収を示さないが, III の還元物 (VII) は $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 204 m μ (log ϵ = 3.83) に幅広い吸収を示した。

また一般に強心性ゲニンにおける $\Delta^{8(14)}$ は Δ^{14} より右旋性の傾向にあるが,³⁾ III は II より右旋性を示した。

さらに二重結合の位置をたしかめるために NMR スペク

Fig. 2. NMR Spectra of Δ^{14} -Anhydrogamabufotalin (II) and $\Delta^{8(14)}$ -Anhydrogamabufotalin (III) in CF_3COOH with Varian A-60

*3 Pt または Pd により不飽和ラクトンとともに Δ^{14} も還元されるが, $\Delta^{8(14)}$ は還元されにくい。

*4 中性物は純粋に分離したものではないが, 不飽和ラクトンは還元され bufadienolide 特有の 300 m μ の吸収を示さない。

2) P. Bladon, H. B. Henbest, G. W. Wood : J. Chem. Soc., 1952, 2737; P. S. Ellington, G. D. Meakins : *Ibid.*, 1960; 697 J. H. Chapman, A. C. Parker : *Ibid.*, 1961; 2075 H. P. Sigg, T. Reichstein : *Helv. Chim. Acta*, 39, 1956; 1507 A. Lardon, T. Reichstein : *Ibid.*, 41, 904 (1958); K. Stich, G. Rotzler, T. Reichstein : *Ibid.*, 42, 1480 (1959); R. A. Michel, T. H. Applewhite : J. Org. Chem., 27, 345 (1962).

3) S. Smith : J. Chem. Soc., 1935; 1050 H. M. E. Cardwell, S. Smith : *Ibid.*, 2012 (1954); L. F. Fieser, M. Fieser : "Steroids" 752 (1959) Reinhold, New York.

トルの測定を行なった。^{*5} II の溶解直後のスペクトル (Fig. 2a) のビニル水素領域には不飽和ラク톤の水素による吸収以外に、分離不十分な三重線とみられる稍幅の広い 1 個の吸収 (1H に相当) が観察されるに反し、III のスペクトル (Fig. 2b) にはこの吸収を欠く。したがって II は 3 置換、III は 4 置換二重結合を有することが明らかである。

以上の結果から gamabufotalin のエタノール性塩酸処理により生成する二異性体の構造は既報¹⁾とは異なり m.p. 204° を示すものが Δ^{14} 体であり、m.p. 259~261° を示すものが $\Delta^8(14)$ 体である。

また 0.5N および N エタノール性塩酸による両異性体の生成比 II : III はそれぞれ約 3 : 1 および 1 : 5 であり、II はさらに N エタノール性塩酸によってほとんど III になるから、この反応経路は I から Δ^{14} 体 (II) が生成し、ついで $\Delta^8(14)$ 体 (III) に移行するものと思われる。

なおエタノール性希酸の代わりにオキシ塩化リンまたは塩化チオニルで脱水すれば主として Δ^{14} 体を生成することが知られている。⁴⁾ それで gamabufotalin diacetate を常法に従いピリジン中オキシ塩化リンまたは塩化チオニル処理し、II の diacetate との同定を試みたが、 Δ^{14} -anhydrogamabufotalin diacetate を結晶としてうることができなかった。

Anhydrogamabufotalin の構造と生理作用について⁵⁾ anhydrogamabufotalin は生理作用^{*6}において両異性体間に差を認めないが、gamabufotalin と比較した場合作用は相当減弱するが消失しない。一方 gamabufotalin の側鎖不飽和ラク톤を還元または開裂したものは作用を全く消失し、また resibufogenin,⁶⁾ cinobufagin,⁷⁾ cinobufotalin⁸⁾ のごとく 14~15 に β -oxide を有するものが作用を示すことから、従来強心性ゲニンの生理作用発現のために不可欠とされている 14 β -OH および側鎖不飽和ラク톤において、14 β -OH より不飽和ラク톤の方がより作用の主体をなす因子と思われる。また anhydrodigitoxigenin が全く作用を消失することから、5 員環の不飽和ラク톤より 6 員環の方がその生理性は大きいといえる。

実験の部

Gamabufotalin (I) に 0.5N エタノール性塩酸の作用 m.p. 258° の gamabufotalin 640 mg. に 0.5N EtOH-HCl 20 ml. を加え水浴上 2 hr. 加熱。冷後水 50 ml. を加え CHCl_3 -Et₂O 抽出。H₂O, 5% NaHCO₃, H₂O で順次洗い Na₂SO₄ 乾燥して粗生成物 673 mg. ベンゼン- CHCl_3 (1 : 1) に溶解し Al₂O₃ 15 g. により分画して Table I を得。分画 (以下 Fr) 1~4 を合し AcOEt より結晶化。II は粒状品、III は長細針状品を与える。AcOEt および MeOH から再結晶を繰返して m.p. 204° の II 274 mg. [α]_D^{21.5} +17.0° (c=0.7, MeOH),

TABLE I. Chromatographic Separation of the Product which treated with 0.5N HCl (C₂H₅OH) on Al₂O₃

Fr. No.	Solvent	Eluate (mg.)	Composition
1	C ₆ H ₆ -CHCl ₃ 1 : 1~3 : 2	212	II + III
2	C ₆ H ₆ -CHCl ₃ 3 : 2	90	"
3	"	67	"
4	"	45	"
5	CHCl ₃	128	II + III + I
6	CHCl ₃ -MeOH 9 : 1	5	I
Total		547	

*5 測定条件：溶媒はトリ弗化酢酸，外部標準テトラメチルシラン（詳細は実験の部参照）。

*6 強心および呼吸，血圧作用。

4) F. Hunziker, T. Reichstein : Helv. Chim. Acta, **28**, 1472 (1945).

5) 岡田，須賀，高堀，石原，小椋：乙卯研，**10**, 27 (1959)；岡田，酒井，須賀：乙卯研 **11**, 67 (1960).

6) H. Linde, K. Meyer : Helv. Chim. Acta, **42**, 807 (1959).

7) P. Hofer, H. Linde, K. Meyer : *Ibid.*, **43**, 1955 (1960).

8) F. Bernoulli, H. Linde, K. Meyer : *Ibid.*, **45**, 240 (1962).

m.p. 259~261° のⅢ 68 mg, $[\alpha]_D^{21.5} + 90.2^\circ$ ($c=0.66$, MeOH) を得。Fr. 5 は汙級クロマトグラフィー (以下 P.P.C.) により未反応の gamabufotalin が主である。

Gamabufotalin に *N* エタノール性塩酸の作用 gamabufotalin 2.1 g. を EtOH 73 ml. に溶かし 2*N* HCl 73 ml. を加え沸騰水浴上 3.5 hr. 加熱。冷後水 150 ml. を加え減圧下に EtOH 可及的留去。CHCl₃ 抽出し以下 0.5*N* EtOH-HCl の場合と同様に処理して粗生成物 1.8 g. ベンゼン-CHCl₃ (3:1) に溶かし Al₂O₃ 40 g. により分画して Table II を得。Fr. 2~7 を含し MeOH, AcOEt より結晶化を繰返して Ⅱ 168 mg., Ⅲ 850 mg.

TABLE II. Chromatographic Separation of the Product which treated with *N* HCl (C₂H₅OH) on Al₂O₃

Fr. No.	Solvent	Eluate (mg.)	Composition
1	C ₆ H ₆ -CHCl ₃ 3:1	203	Ⅱ + Ⅲ
2	C ₆ H ₆ -CHCl ₃ 1:1	285	"
3	"	252	"
4	"	140	"
5	CHCl ₃	300	"
6	"	58	Ⅱ + Ⅲ + I
7	CHCl ₃ -MeOH 1:1	25	"
8	MeOH	208	"
Total		1471	

Δ¹⁴-Anhydrogamabufotalin (Ⅱ) に *N* エタノール性塩酸の作用 m.p. 204° の Ⅱ 50 mg. を EtOH 8 ml. に溶かし 2*N* HCl 8 ml. を加え沸騰水浴上 3 hr. 加熱。冷後水 30 ml. を加え減圧下に EtOH 可及的留去。以下前項同様に処理して粗生成物 48 mg. CHCl₃ に溶かし Al₂O₃ 層を通過させ MeOH より m.p. 259~261° の長針状晶 (Ⅲ) を得。未反応の Ⅱ は得られず。

Δ¹⁴ および Δ⁸⁽¹⁴⁾-Anhydrogamabufotalin (Ⅱ, Ⅲ) に *p*-Nitrobenzoyl chloride の作用 m.p. 204° の Ⅱ 50 mg. を無水ピリジン 2 ml. に溶かし新製の *p*-nitrobenzoyl chloride 0.1 g. を加え一夜放置。反応液を氷水中に注ぎ AcOEt 抽出。抽出液を 2*N* H₂SO₄, 2*N* Na₂CO₃, H₂O で順次洗い Na₂SO₄ 乾燥して粗生成物 56 mg. Me₂CO に溶かし Al₂O₃ 層を通過させ Me₂CO-EtOH より精製して淡黄白色の無晶物を得。Δ¹⁴-anhydrogamabufotalin bis(*p*-nitrobenzoate) C₂₄H₃₀O₄(C₇H₄O₃N)₂ Anal. Calcd.: N, 4.10. Found: N, 4.08. m.p. 259~261° の Ⅲ 47 mg. を無水ピリジン 2 ml., *p*-nitrobenzoyl chloride 0.1 g. によりアチル化して粗生成物 52 mg. 以下 Ⅱ の場合と同様に処理して淡黄白色の無晶物を得。Δ⁸⁽¹⁴⁾-anhydrogamabufotalin bis(*p*-nitrobenzoate) C₂₄H₃₀O₄(C₇H₄O₃N)₂ Anal. Calcd.: N, 4.10. Found: N, 4.23.

Gamabufotalin diacetate に POCl₃ の作用 m.p. 265~266° の gamabufotalin diacetate 105 mg. を無水ピリジン 1.2 ml. に溶かし POCl₃ 0.3 ml. を加え 18°, 24 hr. 放置。黒褐色の反応液を氷水中に注ぎ CHCl₃ 抽出。2*N* HCl, 1% KHCO₃, H₂O で順次洗い Na₂SO₄ 乾燥して粗生成物 100 mg. を得。ベンゼン-CHCl₃ に溶かし Al₂O₃ 層を通して精製。P.P.C. では Ⅱ または Ⅲ の diacetate*7 と同一の R_f を示し単一であるが結晶しない。

Gamabufotalin diacetate に SOCl₂ の作用 m.p. 266° の gamabufotalin diacetate 80 mg. を無水ピリジン 3 ml. に溶かし SOCl₂ 0.8 ml. を加え 0° で 1 hr. 反応。以下 POCl₃ の場合と同様に処理して粗生成物 81 mg. を精製。P.P.C. における態度は Ⅱ または Ⅲ の diacetate と同じであるが結晶しない。

Δ¹⁴ および Δ⁸⁽¹⁴⁾-Anhydrogamabufotalin (Ⅱ, Ⅲ) の還元 m.p. 204° の Ⅱ 127 mg. をあらかじめ接触還元した MeOH 50 ml. に溶かし新製の PtO₂·H₂O 0.1 g. を加え H₂ 気流中 65 min. 振とう。PtO₂ 汙別後 MeOH 留去。CHCl₃ に溶かし 2*N* Na₂CO₃ で 3 回振出して酸性部と中性部に分け、酸性部は *N* HCl でリトマス中性とし CHCl₃ 抽出。各部を水洗後 Na₂SO₄ 乾燥して酸性部 67 mg., 中性部 (Ⅵ) 61 mg. を得。また m.p. 259~261° の Ⅲ 50 mg. を MeOH 50 ml. に溶かし PtO₂·H₂O 少量を加え 40 min. 接触還元。以下 Ⅱ の場合と同様に処理して酸性部 24 mg., 中性部 (Ⅶ) 18 mg. を得。*8

汙紙クロマトグラフィー Zaffaroni system による。汙紙は Whatman No. 1 を使用した。ベンゼン-

*7 Ⅱ, Ⅲ を常法通りピリジン中 Ac₂O 処理して得られる diacetate は P.P.C., 薄層クロマトグラフィー (実験の項参照) において単一であるが結晶しない。また両者は同一の R_f 値を示す。

*8 Ⅵ, Ⅶ を短波長域の UV 吸収スペクトル測定に使用した。

CHCl_3 (1:1)/propylene glycol- H_2O (4:1) Rf I 0.05, II および III 0.70. ベンゼン- CHCl_3 (3:2)/formamide Rf I 0.04, II および III 0.55. ベンゼン-heptane (1:1)/propylene glycol- H_2O (4:1) Rf gamabufotalin diacetate 0.65, II および III の diacetate 0.90.

薄層クロマトグラフィー⁹⁾ 吸着剤, 薄層用シリカゲル (トーションレヤー G), アルミナ G (メルク). 140° , 1 hr. 活性化. 層厚 0.5 mm. 溶剤 Me_2CO -cyclohexane (3:7), Me_2CO - CHCl_3 (3:7), iso-BuOH-cyclohexane (1:9). 展開時間 40 min. 以上いずれの場合も両アンヒドロ体は分離しない. シリカゲル, Me_2CO -cyclohexane (3:7) の場合の Rf I 0.18, II および III 0.21, gamabufotalin diacetate 0.27, II および III の diacetate 0.33.

NMR の測定と解析 測定は Varian 社 A-60 型スペクトロメーターを使用し 60 Mc/sec. で測定した. 試料の有機溶媒に対する溶解度が小さいためトリ弗化酢酸を溶媒に, テトラメチルシランを外部標準として用いた. 化学シフト (δ) はテトラメチルシランからの p.p.m. をもって示し, 結合常数 (J) は c.p.s. で示した. 各シグナルの帰属はつぎのとおりである. ただし s, d および br の略号はそれぞれ singlet, doublet, broad を意味する. II Fig. 2 の a: $\delta=0.49$ (s) 19 Me (または 18 Me); $\delta=0.86$ (s) 18 Me (または 19 Me); $\delta=4.12$ (br) 3 および 11 の >CHOH ; $\delta=5.13$ 15 H, $J_{15,16}$ は約 3 c.p.s. であるが明瞭には分離せずやや幅広い singlet のように見える. その原因は $J_{8,15}$ の long range coupling と 2 けたの >CHOCOCF_3 によるものと考えられる; $\delta=6.35$ (d, $J=9.5$) 23H; $\delta=7.48$ (d, $J=9.5$) 22H, 21H との coupling のためやや幅広くなっている; $\delta=7.27$ (s) 21H, 22H との coupling のためやや幅広い. III Fig. 2 の b: $\delta=0.47$ (s) 19 Me (または 18 Me); $\delta=0.63$ (s) 18 Me (または 19 Me); $\delta=4.13$ (br) 3 および 11 の >CHOH ; 以下 23H, 22H, 21H の様相は II と全く同じ. なお溶解後の時間の経過とともに $\delta=4.0$ 付近の幅広いシグナル (>CHOH) の減少および $\delta=5.0$ 付近のシグナル (>CHOCOCF_3) の生成がいずれの物質にも観察された. また I のスペクトルでは以上の変化のほか $\delta=5.13$ の吸収が増大し, Me 領域に $\delta=0.46, 0.63, 0.83$ の 3 本の吸収がみられる. この変化は I から II および III あるいはそれらのアシル化体が生成したことを示す.

UV スペクトルの測定 測定は日立 EPS-2U 形自記分光光度計によった. 光源, 水素放電管. 分散プリズム, リトロー形石英プリズム. セル 1 cm. period 4, λ -speed 10, sensitivity 6, N_2 ガスを約 10 min. 送って感度を高めた. 溶媒は吸収スペクトル用 MeOH を使用した. MeOH の吸収測定下限は約 200 m μ . $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ m μ (log ϵ): II, 203 (3.95), III, 205 (4.20).

本研究の終わりに臨み発表を許可された当社副社長 上原昭二氏, 御指導いただいた研究部長 大野節郎博士に謝意を表します. また薬理を担当された東京医科歯科大学 岡田正弘教授, 核磁気共鳴について御教示いただいた東北大学 伊東 椒教授, 研究に御助力願った当研究部 釜野徳明氏に深謝致します.

大正製薬株式会社研究部