

Harry Auterhoff und Michael Kliem*)

Die Nachweisreaktion von Griseofulvin mit Kaliumdichromat in Schwefelsäure

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen
(Eingegangen am 2. Juni 1975)

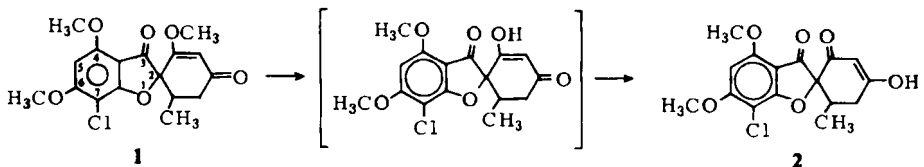
Die beim Lösen von Griseofulvin in konzentrierter Schwefelsäure auftretende Gelbfärbung beruht auf der Bildung von Oxonium-Salzen insbesondere der Griseofulvinsäure.

Die bei der Oxidation mit Kaliumdichromat auftretende Rotfärbung wird mit der Bildung des Orthochinons **4** erklärt. Für ein Zwischenprodukt konnte die Brenzkatechinstruktur **3a** durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie gesichert werden.

The Reaction of Griseofulvin with Potassium Dichromate in Sulfuric Acid

The yellow colour obtained by griseofulvin in sulfuric acid depends on oxonium salts of chiefly griseofulvinic acid. The wine-red colour produced by oxidation with potassium dichromate is explained through the orthoquinone **4**. The structure of an intermediate has been confirmed by ^{13}C -nmr-spectroscopy as **3a**.

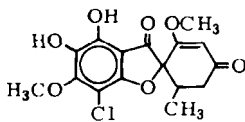
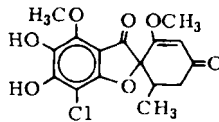
Nach der Ph. Eur. wird Griseofulvin (**1**) mit einer Reaktion identifiziert, die auf *Laubie*¹⁾ zurückgeht und bei der man die Substanz in konz. Schwefelsäure mit Kaliumdichromat versetzt, wobei eine dunkelrote Färbung auftritt. Ohne den Kaliumdichromatzusatz ist die Lösung von **1** in Schwefelsäure intensiv gelb gefärbt. Wird diese Lösung mit Wasser zersetzt, so erhält man einen farblosen Niederschlag, der nach dem Dünnschichtchromatogramm aus zwei Substanzen besteht. Durch präparative DC wurden 81 % unverändertes **1** und 10 % einer Substanz **2** isoliert, die als Griseofulvinsäure identifiziert wurde. Die Gelbfärbung von **2** in konzentrierter Schwefelsäure beruht auf der Bildung von Oxoniumsalzen, erkennbar an den ausgeprägten UV-Maxima bei 280 und 320 nm. Die Oxoniumsalze der Griseofulvinsäure, die eine 1,3-Diketonstruktur hat, sind intensiver gefärbt als die des Griseofulvins.



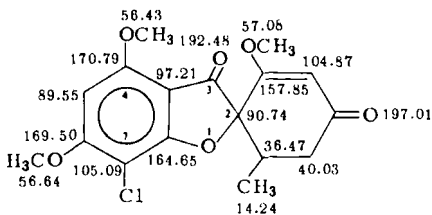
* Aus der Dissertation von *Michael Kliem*, Tübingen 1975.

1 H. Laubie, Bull. Soc. pharmac. Bordeaux 99, 4 (1960),

Gibt man zur Lösung von **1** in konzentrierter Schwefelsäure Kaliumdichromat, so entsteht eine dunkelrote, mehrere Stunden haltbare Rotfärbung, die aus der Lösung nicht extrahiert werden kann. Verdünnt man die Lösung mit Wasser, so fällt ein gelbbraunes undefiniertes Produkt mit einem Schmelzpunkt über 350° aus. Einen Hinweis auf den möglichen Reaktionsverlauf geben Zwischenprodukte, die man in besseren Ausbeuten erhält, wenn größere Mengen Griseofulvin mit Chromschwefelsäure bei niedriger Temperatur behandelt werden. Beim Ausgießen auf Eis wird ein blaßgelber Niederschlag gewonnen. Das Dünnschichtchromatogramm des Niederschlages zeigt neben Substanzen, die am Start bleiben und Verunreinigungen hauptsächlich zwei Substanzen an, die mit keinem bisher bekannten Oxidationsprodukt von **1** identisch sind. Mit Chromschwefelsäure werden beide Substanzen dunkelrot, in Aceton gelöst geben sie mit Eisen(III)-chlorid eine Grünfärbung. Die NMR-Spektren beider Substanzen sind gleich und zeigen, daß der Enonring von **1** erhalten geblieben ist. Das aromatische Proton ($\delta = 6,2$ ppm gegen TMS) sowie eine aromatische Methoxygruppe ($\delta = 4,1$ ppm gegen TMS) von **1** fehlen. Danach konnte gefolgert werden, daß den Substanzen die Formeln **3a** bzw. **3b** zukommen:

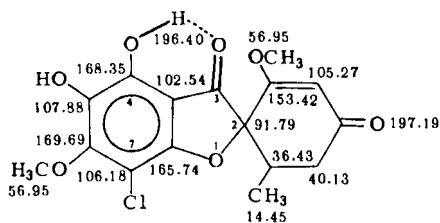
**3a****3b**

Die Bestätigung für die Formel **3a** brachte die ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie*). Beide an einer Kieselgel-Trockensäule getrennten Substanzen erwiesen sich als identisch, nur war ihr Reinheitsgrad verschieden. Verglichen wurde das ^{13}C -NMR-Spektrum von **3a** mit dem von **1**:



^{13}C -Signalzuordnung ($-\delta$ in ppm gegen TMS) beim Griseofulvin

* Wir danken Prof. Dr. E. Breitmaier vom Chemischen Institut der Universität Tübingen für die Aufnahme und Interpretation der Spektren.



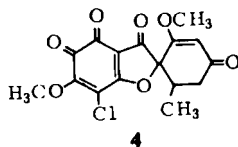
^{13}C -Signalzuordnung ($-\delta$ in ppm gegen TMS) bei Substanz 3a

Unterschiedliche ppm-Werte bei Griseofulvin und Substanz 3a

C-Atom	Griseofulvin	Substanz 3a
3	192,48	196,40
4	170,79	168,35
5	89,55	107,88

Die Verschiebung zu tieferem Feld des C-3-Atoms ist auf eine Chelatbildung mit einer benachbarten OH-Gruppe zurückzuführen. Diese OH-Gruppe ist nach den gefundenen Daten nur am C-4 möglich. Die Differenz von 18,33 ppm am C-5-Atom beweist die Einführung einer Hydroxylgruppe.

Da 3a eine Zwischenstufe zur Rotfärbung ist, muß dem Farbprodukt die Struktur des 4,5-Orthochinons 4 zukommen, das aber zu labil ist, um als solches isolierbar zu sein. Die Reaktion ist spezifisch für 4,6-Dimethoxycumaranonderivate, die in 2,7-Stellung substituiert sind (vgl. Dissertation *M. Kliem*).



Beschreibung der Versuche

Reaktion der Ph. Eur.

5 mg 1 werden in 1 ml konz. Schwefelsäure gelöst. Die Lösung wird mit 5 mg Kaliumdichromat versetzt.

Gelbfärbung von 1 mit Schwefelsäure

300 mg 1 werden in 30 ml konz. Schwefelsäure 24 Std. gerührt, die Lösung in 100 ml Eiswasser gegossen, der Niederschlag abfiltriert, gewaschen und getrocknet. Ausbeute 98 %.

DC: Polygram Sil-N-HR/UV 254. Fließmittel: Benzol, Chloroform, Methyläthylketon, Ameisensäure = 30 + 30 + 39 + 1. Rf von 1 = 0,51, von 2 = 0,36.

Trennung: Präp DC Merck PSC F 254. Fließmittel wie oben. Aufgetragen wurden 50 mg, gewonnen 41 mg 1 (Schmp. 220°), 5 mg 2 (Schmp. 250°).

Gewinnung des Zwischenproduktes mit Brenzkatechinstruktur

300 mg 1 wurden in 20 ml gekühlter konz. Schwefelsäure gelöst und mit einer gekühlten Lösung von 100 mg Kaliumdichromat in 10 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Die Temperatur des Ansatzes wurde auf 5° gehalten. Nach 15 Min. wurde die Reaktionslösung in 200 ml Eiswasser gegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, gewaschen, in Chloroform gelöst und die Chloroformlösung bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Die Chloroformlösung wurde 3 Mal mit 1 proz. NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Aus der Chloroformphase wurden 13 mg 1 zurückgewonnen. Die Hydrogencarbonatphase wurde mit Weinsäure angesäuert und der Niederschlag mit Chloroform extrahiert. Ausbeute: 82 mg.

DC: Kieselgel F 254 „Merck“. Fließmittel: Äther, Chloroform, Methyläthylketon, Ameisensäure = 50 + 40 + 10 + 1. Rf von 3 = 0,20 und 0,15.

Trennung: Trockensäule Kieselgel Woelm (l = 50 cm, ϕ 1,5 cm) + 10 % H₂O.

Fließmittel: Chloroform, Aceton, Ameisensäure 98 + 1 + 1, aufgetragene Menge 200 mg. Ausbeute: 54 mg erste Fraktion (= 27 %), 26 mg zweite Fraktion (= 13 %).

¹³C-NMR-Spektren

Protonen-breitbandentkoppelte Impuls-Fourier-Transform-Spektren. Bruker HF X-90-Multikern-NMR-Spektrometer (Meßkanal 22,628 MHz für ¹³C; MHz für ²H). Impulsbreite: 4–5 μ sek für 90°-Impulse. Meßzeit pro Interferogramm 0,4–0,8 sek. 16000 bis 110000 Interferogramme wurden in einem Fabritek-1074-Rechner (4 bzw. 8 k/12/9 Bit) akkumuliert. DEC-PDP-8-I-Rechner zur Fourier-Transformation. Die ¹³C-chem. Verschiebungen wurden auf \pm 0,1 ppm genau berechnet.

Lösungsmittel: CDCl₃. Gemessen gegen TMS: δ TMS = δ (CDCl₃) – 79,2283 ppm)

Substanzmenge: 1-60 mg, erste Fraktion 3-90 mg, zweite Fraktion 3-60 mg.

Wir danken der Fa. Hoechst für die Überlassung von Griseofulvin, dem Fonds Chemie für die Unterstützung der Arbeit.