

3-Amino-3,4-dihydro-6,7-dihydroxy-cumarin-hydrobromid (**2**). 15,0 g (0,059 Mol) 3-(2,4,5-Tri-methoxyphenyl)-DL-alanin (**1b**) wurden in 75 ml farbloser, 48-proz. wässriger Bromwasserstoffsäure unter Inertgas 2,5 Std. g. kocht. Man liess auf 70–80° abkühlen und destillierte die überschüssige Bromwasserstoffsäure am Wasserstrahlvakuum ab. Der Rückstand erstarrte meist kristallin, gelegentlich aber bildete sich ein Schaum. In solchen Fällen gab man 10–20 ml Wasser zu und dampfte erneut langsam zur Trockene ein. Der Rückstand wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wobei man 16,2 g (100%) eines beigen Produktes mit Smp. 280–283° (Zers.) erhielt, das für die Darstellung von **3** genügend rein war. Aus Methanol-Äther in Gegenwart von SO₂ umkristallisiert, erhält man ein helles mikrokristallines Pulver vom Smp. 284°. IR. (in KBr): 1750 cm⁻¹ (C=O).

C₉H₉NO₄·HBr (276,10) Ber. C 39,15 H 3,65 Br 28,94% Gef. C 39,35 H 4,00 Br 28,74%

3-(2,4,5-Trihydroxyphenyl)-DL-alanin (**3**). In 250 ml sauerstofffreiem Wasser wurden unter Inertgas 27 g rohes 3-Amino-3,4-dihydro-6,7-dihydroxy-cumarin-hydrobromid (**2**) 5 Min. gekocht und danach von einer kleinen Menge schwarzen Rückstandes durch Dicalite filtriert. Das Filtrat wurde unter Luftausschluss im Vakuum auf ca. 100 ml eingengt und mit 25 ml sauerstofffreiem Acetonitril und 27 ml Propylenoxid versetzt. Nach wenigen Minuten begann die Kristallisation, das Gemisch verfärbte sich, und nach ca. 2 Std. war das pH auf 5–6 gestiegen. Nun begaste man mit SO₂ und tropfte sehr langsam unter Rühren 75 ml Acetonitril zu. Am folgenden Tag wurden die schwach gefärbten Kristalle abfiltriert, mit Acetonitril/Wasser 3:1, dann mit Acetonitril allein nachgewaschen und getrocknet. Man erhielt 14,7 g (71%) fast reines **3** vom Smp. 265° (Zers.). Nach Umkristallisieren aus viel SO₂-haltigem Wasser blieb der Smp. unverändert. IR. (in KBr): 1632 cm⁻¹ (C=O).

C₉H₁₁NO₅ (213,19) Ber. C 50,70 H 5,20 N 6,57% Gef. C 50,53 H 5,53 N 6,65%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. THOENEN & J. P. TRANZER, Arch. expt. Pathol. Pharmacol. **261**, 271 (1968).
- [2] J. W. DALY, J. BENIGNI, R. MINNIS, Y. KANAOKA & B. WITKOP, Biochemistry **4**, 2513 (1965).
- [3] G. A. SWAN, Ann. N. Y. Acad. Sci. **100**, 1005 (1963).
- [4] P. K. SHARMA, M. K. MENON & P. C. DANDIYA, J. pharmaceut. Sci. **53**, 1055 (1964).
- [5] M. P. J. M. JANSEN, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **50**, 291 (1929).

122. Über neue Bufadienolide aus *Ch'an Su*

Über Krötengifte, 34. Mitteilung¹⁾

von Niklaus Höriger, Horst H. A. Linde und Kuno Meyer

Pharmazeutisches Institut der Universität Basel

(3. V. 69)

Summary. Two new bufadienolides, isolated from *Ch'an Su*, are proved to be 19-oxo-cinobufagin (III) and 19-oxo-cinobufotalin (V), respectively.

Bei der säulenchromatographischen Aufteilung der chloroformlöslichen Bestandteile von *Ch'an Su* lassen sich nach Eindampfen der einzelnen Fraktionen durch Kristallisation etwa ein Dutzend Bufadienolide gewinnen [3]. Die Mutterlaugen der einzelnen Kristallisate enthalten z. T. noch weitere Substanzen, die sich dünnschichtchromatographisch nachweisen lassen. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über

¹⁾ 33. Mitt. [1], irrtümlicherweise als 32. Mitt. bezeichnet; 32. Mitt. = [2].

Versuche zur Isolierung und Charakterisierung der Bufadienolide unter diesen noch unbekanntem Stoffen.

Die Aufarbeitung der *Ch'an Su*-Droge und die säulenchromatographische Auftrennung der chloroformlöslichen Bestandteile wurden schonender als früher [3] durchgeführt (siehe exper. Teil). Die Fraktionen, die nach DC. die gleichen Substanzen enthielten, wurden vereinigt und zur Kristallisation gebracht. Die eingedampften Mutterlaugen wurden durch wiederholte Säulenchromatographie möglichst von den kristallisierenden bereits bekannten Bufogeninen befreit.

Die Mutterlaugen von Resibufogenin [4] bzw. Cinobufagin [5] enthielten nach DC. noch 3 weitere unpolare Substanzen, die in kleinen Mengen isoliert wurden. Da sie aber im UV. nicht die für Bufadienolide typische Absorption bei etwa 300 nm zeigten, wurden sie nicht näher untersucht (im exper. Teil nicht beschrieben).

Die Mutterlaugen des Bufalins [6] zeigten im DC. noch zwei weitere Flecke von kleineren Rf-Werten, die sich in der Färbung stark voneinander unterschieden. Sie wurden beide nach DC. einheitlich erhalten. Die unpolare Substanz = I ergab Kristalle vom Smp. 195–200°; die polare = III kristallisierte bisher nicht, lieferte aber eine krist. Acetylverbindung vom Smp. 192–195°.

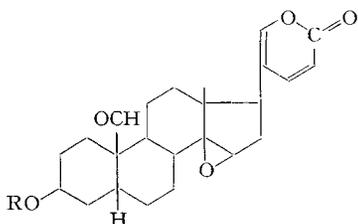
Die Bufotalin [7] bzw. Cinobufotalin [8] enthaltenden Mutterlaugen zeigten im DC. noch einen weiteren Fleck einer polaren Substanz, die denselben Rf-Wert aufwies und die gleiche Färbung gab wie Desacetylcinobufotalin [2]. Da dieses nach unseren bisherigen Beobachtungen aus Cinobufotalin nur bei der Chromatographie an Al_2O_3 und nicht an Kieselgel, das wir hier ausschliesslich verwendeten, entsteht, haben wir auch diese sich wie Desacetylcinobufotalin verhaltende Substanz = V so lange chromatographisch aufgetrennt, bis sie im DC. nur noch einen Fleck gab. Sie kristallisierte bisher noch nicht, aber ihre Acetylverbindung VI ergab Kristalle vom Smp. 225–238°.

Die Mutterlaugen von Arenobufagin [9] zeigten im DC. noch einen unpolaren Doppelfleck, dessen oberer (unpolarer) Teil sich wie Cinobufagin und dessen unterer Teil sich wie Resibufogenin anfärbte. Nach Säulenchromatographie wurde die unpolare Substanz VIII in feinen Nadelchen, Smp. 130–135°, nach DC. nicht ganz einheitlich, erhalten. VIII zeigte saure Eigenschaften, indem es sich aus Chloroform mit verd. Sodalösung ausschütteln liess, worauf der Smp. auf 137–139° anstieg. VIII gab mit ätherischer Diazomethanlösung ein kristallisiertes Methylierungsprodukt IX vom Smp. 103–105°. (Zur Konstitution siehe unten.)

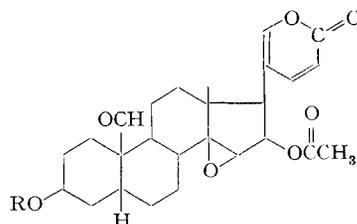
Die Substanzen I, III, V und VIII absorbieren alle im UV. selektiv im Bereich von 292–300 nm ($\log \epsilon = 3,59\text{--}3,80$) und können demnach Bufadienolide sein. Bestätigt wurde die Anwesenheit eines α -Pyrone-Ringes durch die IR.-Spektren (Banden bei etwa 1720, 1630 und 1535 cm^{-1}) und die NMR.-Spektren (in $CDCl_3$) mit den für einen α -Pyrone-Ring typischen Signalen bei etwa 8,0 ppm (Quartett; $J = 10$ Hz und 2,5 Hz: C(22)-H); 7,25 ppm (Dublett; $J = 2,5$ Hz: C(21)-H) und 6,3 ppm (Dublett; $J = 10$ Hz: C(23)-H).

Die Konstitution der Substanz I ergibt sich aus den von KAMANO *et al.* [11] veröffentlichten Daten für Resibufagin (= 19-Oxoresibufogenin), die mit den unsrigen übereinstimmen.

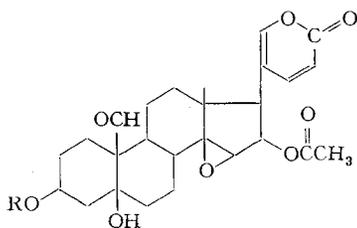
Das NMR.-Spektrum von Substanz III zeigte Signale bei: 9,47 ppm (1 H, verbreitetes Singulett mit Signallbreite bei halber Höhe von 3 Hz: C(19)-Aldehyd-H); 5,5 ppm (1 H, Quartett; $J = 9,5$ Hz und 1,5 Hz: C(16)- α H); etwa 4,25 ppm (1 H, brei-



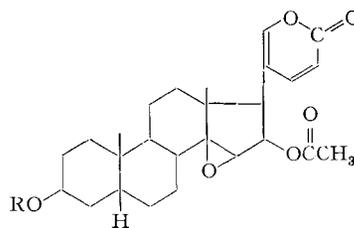
I R = H Resibufagin
 Smp. 210–212° [11]
 II R = –CO–CH₃
 Smp. 195–199° [11]



III R = H 19-Oxocinobufagin
 amorph
 IV R = –CO–CH₃
 Smp. 192–195°



V R = H 19-Oxocinobufotalin
 amorph (+ 19)²⁾
 VI R = –CO–CH₃
 Smp. 225–238° (+ 28)²⁾



VII R = H Cinobufagin [5]
 VIII R = –CO–(CH₂)₆–COOH
 Smp. 138–140° [10]
 IX R = –CO–(CH₂)₆–COOCH₃
 Smp. 103–105° [10]

tes Singulett: C(3)– α H); etwa 3,67 ppm (1 H, Dublett; $J = 1,5$ Hz: C(15)– α H); 2,83 ppm (1 H, Dublett; $J = 9,5$ Hz: C(17)– α H); 1,9 ppm (3 H, Singulett: C(16)-Acetoxygruppe); 0,93 ppm (3 H, Singulett: 18-CH₃, berechnet [12]: 0,92 ppm). Das M^+ zeigte m/e 456 entsprechend C₂₆H₃₂O₇. Aus diesen Daten ergibt sich für dieses 19-Oxobufadienolid die Struktur III.

NMR.-Spektrum der Substanz V: Signale bei 10 ppm (1 H, verbreitetes Singulett mit Signalbreite bei halber Höhe von etwa 2 Hz: C(19)-Aldehyd-H); 5,33 ppm (1 H, Quartett; $J = 9,5$ Hz und 2 Hz: C(16)– α H); 4,09 ppm (1 H, breites Singulett: C(3)– α H); 3,55 ppm (1 H, Dublett; $J = 2$ Hz: C(15)– α H); 2,72 ppm (1 H, Dublett; $J = 9,5$ Hz: C(17)– α H); 1,87 ppm (3 H, Singulett: C(16)-Acetoxygruppe); 0,82 ppm (3 H, Singulett: 18-CH₃, berechnet [12] 0,82 ppm). – Das M^+ der Acetylverbindung VI zeigte m/e 514 entsprechend C₂₈H₃₄O₉. Das IR.-Spektrum von VI wies bei etwa 2,80 μ eine scharfe Bande auf, die bedingt sein kann durch eine H-Brücke von C(5)–OH nach der C(3)-Acetoxy- bzw. nach der 19-Oxo-Gruppe, letzteres vor allem, da das C(19)-Aldehydproton im NMR. gegenüber demjenigen in I und III um 0,5 ppm nach niedrigerem Feld verschoben ist. Danach kommt für dieses Bufadienolid ein 5 β -OH oder ein 8 β -OH in Frage. Auf Grund der chemischen Verschiebung der 18-Methylgruppe wird aber ein 8 β -OH ausgeschlossen, da dieses nach GSELL & TAMM [12] für das 18-CH₃ einen Wert von 1,103 ppm geben müsste. Dass V tatsächlich eine C(5)–OH-

²⁾ Die Zahlen in runden Klammern geben die auf ganze Grade auf- oder abgerundete spezifische Drehung für Na-Licht in Chloroform an.

Gruppe besitzt, konnte durch Dehydrierung zur 3-Ketoverbindung und anschliessende Wasserabspaltung bewiesen werden. Das so erhaltene Produkt zeigte bei etwa 242 nm die für eine 3-Keto-*A*-Verbindung typische selektive Absorption.

Die Konstitution von VIII und damit auch für IX ergibt sich aus dem von KAMANO *et al.* [10] veröffentlichten Daten für 3-O-Suberyl-cinobufagin und dessen Methylester, die mit den von uns gefundenen Daten übereinstimmen.

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. Frl. S. SPENGLER (Pharmazeutisches Institut der Universität Basel) danken wir herzlich für die Aufnahme der NMR.-Spektren sowie Herrn Dr. W. VETTER (F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel) für die Aufnahme der MS.-Spektren.

Experimentelles. – 1. *Allgemeines.* – Alle *Smp.* wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze $\pm 2^\circ$.

Abkürzungen: Ac₂O = Essigsäureanhydrid, AcOH = Essigsäure, Ä = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Bz = Benzol, Chf = Chloroform, Cy = Cyclohexan, DC. = Dünnschicht, Dünnschichtchromatographie bzw. dünn-schichtchromatographisch, E = Essigsäureäthylester, Fr. = Fraktion(en), Isop = Isopropanol, SiO₂ = Kieselgel (zur Säulenchromatographie «MERCK» 0,05–0,2 mm, zur DC. «CAMAG» D5 mit 0,5% Leuchtpigment ZS Super «RIEDEL-DE HAËN»), M⁺ = Molekelion, Me = Methanol, ML. = Mutterlauge(n)rückstände, Pe = Petroläther, Py = Pyridin, W = Wasser.

DC.-Chromatographie: Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurde nach Besprühen mit konz. H₂SO₄-Alk-(1:1) auf etwa 100–120° erhitzt.

Analytisches: Die Molekulargewichte wurden massenspektroskopisch bei etwa 70 eV und mit Direkteinlass bestimmt. Die NMR.-Spektren sind in CDCl₃ mit Tetramethylsilan (= 0 ppm) als internem Standard aufgenommen. Als Lösungsmittel für die UV.-Spektren diente 96-proz. Alk, für die IR.-Spektren Methylenchlorid.

2. *Gewinnung der chloroformlöslichen Anteile aus Ch'an Su.* 2,432 kg *Ch'an Su*-Scheiben wurden in der Kugelmühle pulverisiert und in eine grosse Chromatographiesäule, die zur Hälfte mit Chf gefüllt war, unter kräftigem Rühren eingetragen und so lange bei 20° mit Chf perkoliert, bis dieses nach Eindampfen im Vakuum keine Rückstände mehr gab: 620 g Extrakt (als gelbbrauner Schaum). Durch Perkolation mit Chf-Me-(95:5) wurden noch weitere 51 g Eindampfrückstände (als dunkelbrauner Schaum) gewonnen. 300 g des Chf-Extraktes wurden wie früher [3] beschrieben von den Sterinen befreit und hierauf in 2 Portionen an je 1 kg SiO₂ nach der Durchlaufmethode mit Bz-Chf-(3:7), Chf, Chf-Me (199:1), (99:1), (49:1), (19:1), (4:1), (1:1) und Chf-Me (1:1), das 1% AcOH enthielt, chromatographiert. Die einzelnen Fr. der beiden Chromatographien wurden aufgrund des DC. [Systeme Pe-Bz-An-(1:1:1) und Cy-Isop-(7:3)] zu Gruppen vereinigt.

3. *Isolierung von Resibufagin (I) und 19-Oxocinobufagin (III).* Die Gruppe der in erster Linie Bufalin enthaltenden Fr. (34 g) gab aus Me 11,2 g krist. Bufalin. Die ML. wurden in 2 Portionen nochmals an je 300 g SiO₂ aufgetrennt. Die Eluate mit Bz-Chf-(85:15) und Chf enthielten nach DC. in erster Linie Bufalin und Cinobufagin. Die mit Chf-Me-(199:1) und (99:1) gewonnenen Fr. gaben total 4,06 g Eindampfrückstände, die nach DC. I und III neben Bufalin enthielten. Durch Kristallisation liess sich daraus 700 mg Bufalin abtrennen. Die ML. wurden an 200 g SiO₂ mit E-Cy-(1:1) aufgeteilt. Dabei wurden gegen Ende der Chromatographie 500 mg erhalten, die neben Cinobufotalin I enthielten, und 290 mg, die neben Cinobufotalin III enthielten. Die 500 mg wurden nochmals an 600 g SiO₂ mit E aufgetrennt. Die Fr., die nach DC. I enthielten, wurden vereinigt und im Vakuum eingedampft: 60 mg. Aus An-Ä 8 mg Kristalle (Nadeln) vom *Smp.* 195–200°. KAMANO *et al.* [11] fanden hierfür den *Smp.* 210–212°. Die obigen 290 mg, die III enthielten, wurden an 300 g SiO₂ mit Chf-Me-(49:1) chromatographiert. Die Fr., die nach DC. am meisten III enthielten (= 116 mg Eindampfrückstände) wurden auf 6 DC.-Platten 20 × 20 cm, Schichtdicke 0,5 mm, Fließmittel Chf-Me-(97:3) aufgetrennt. Die im UV.-Licht (254 nm) am stärksten erscheinende dunkle Zone wurde markiert und jeweils deren innerer und äusserer Teil gesondert herausgeschabt. Beide Teile wurden für sich mit Chf-Me-(85:15) unter leichtem Erwärmen extrahiert. Das aus dem inneren Teil gewonnene Material (19 mg) war DC.-rein, die aus dem äusseren Teil erhaltenen 10 mg

waren nach DC. nicht ganz einheitlich. Alle Kristallisationsversuche verliefen negativ; sie wurden aufgegeben, da III schon nach wenigen Min. weitgehend zersetzt ist (im DC. festgestellt). - Die Acetylverbindung IV - in Py/Ac₂O bereitet - gab nach präparativer DC. aus wenig Me unter Zusatz von Ä-Pe feine, zu Rosetten vereinigte Prismen vom Smp. 192-195°.

4. *Isolierung von 19-Oxocinobufotalin (V)*. Die Gruppe der nach DC. zur Hauptsache Bufotalin und Cinobufotalin enthaltenden Fr. (8,1 g), wurde in wenig Chf gelöst, mit 10 g SiO₂ verrieben und dieses nach dem Trocknen auf eine mit Cy-Isop-(9:1) bereitete Säule von 300 g SiO₂ gegeben. Cy-Isop-(9:1) und (4:1) eluierten 6,52 g Gemische von Bufotalin und Cinobufotalin. Mit Cy-Isop-(7:3) wurden total 1,42 g von der Säule gelöst, die nach DC. fast reines V darstellten. Sie wurden nochmals, wie vorgehend beschrieben, an 135 g SiO₂ chromatographiert wobei 1,27 g nach DC. einheitliches V resultierte; $[\alpha]_D^{23} = +19^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,37$). V kristallisierte nicht und erwies sich als sehr leicht zersetzlich; es gab nach Acetylierung - in Py/Ac₂O - VI, das aus Me-Ä in feinen Nadeln kristallisierte. Smp. 225-238°; $[\alpha]_D^{23} = +28^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,10$).

5. *Dehydrierung von V und anschliessende Wasserabspaltung*. Eine Lösung von 30 mg V in 0,5 ml An wurde bei 0° mit 1 Tropfen KILIANI-Lösung [13] versetzt. Nach 10 Min. wurde 1 Tropfen W zugefügt und 3mal mit Chf ausgeschüttelt. Nach Verdampfen des Chf im Vakuum erhitzte man den Rückstand in 2 ml AcOH 2 Std. auf 90°. Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chf und Filtrieren durch etwas Al₂O₃ und Verdampfen gab 20 mg. Das UV.-Spektrum des so erhaltenen Produktes zeigte bei 293 nm das für den α -Pyronring typische Maximum sowie bei 242 nm eine stark ausgeprägte Schulter etwa gleicher Intensität. Das Vorliegen eines α,β -ungesättigten 3-Ketons wird durch die Bande im IR.-Spektrum bei 6,0 μ bestätigt.

6. *Isolierung von VIII und Bereitung von IX*. Die Gruppe der hauptsächlich Arenobufagin enthaltenden Fr. (7,1 g) wurde in Me gelöst und gab 3,6 g krist. Arenobufagin. Die ML. (3,5 g) wurden an 350 g SiO₂ mit Chf, Chf-Me-(199:1), (49:1), (19:1) und (4:1) aufgetrennt. Die Eindampfrückstände 280 mg der Fr., die gemäss DC. VIII enthielten, wurden in Ä-Chf-(4:1) gelöst und im Scheidetrichter mit verd. Sodalösung ausgezogen. Die mit Ä-Chf-(4:1) gewaschenen Sodauszüge wurden mit HCl eben kongosauer gemacht, mit Chf extrahiert, dieses nach Waschen mit W über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingedampft. Der Rückstand gab aus An-Ä 118 mg feine Prismen vom Smp. 137-139°. Der mit ätherischem Diazomethan bereitete Methylester IX schmolz bei 103-105°.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. HUBER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* 50, 1994 (1967).
- [2] H. LINDE, P. HOFER & K. MEYER, *Helv.* 49, 1243 (1966).
- [3] J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* 40, 1270 (1957). P. HOFER & K. MEYER, *Helv.* 43, 1495 (1960).
- [4] H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* 42, 807 (1959).
- [5] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* 43, 1955 (1960).
- [6] K. MEYER, *Helv.* 32, 1238 (1949).
- [7] K. MEYER, *Helv.* 32, 1993 (1949).
- [8] F. BERNOULLI, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* 45, 240 (1962).
- [9] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* 43, 1950 (1960).
- [10] Y. KAMANO, H. YAMAMOTO, Y. TANAKA & M. KOMATSU, *Tetrahedron Letters* 1968, 5673.
- [11] Y. KAMANO, H. YAMAMOTO, K. HATAYAMA, Y. TANAKA, M. SHINOHARA & M. KOMATSU, *Tetrahedron Letters* 1968, 5669.
- [12] L. GSELL & CH. TAMM, *Helv.* 52, 551 (1969).
- [13] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JOHNS & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* 1946, 39.