

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] a) *R. Hegnauer*, *Pharmac. Acta Helv.* **36**, 21 (1961); b) *idem*, «Chemotaxonomie der Pflanzen», **7**, 283–286, Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart 1962.
- [2] *A. Penttilä & J. Sundman*, a) *J. Pharmacy Pharmacol.* **13**, 531 (1961); b) *Acta chem. scand.* **16**, 1251 (1962); c) *ibid.* **17**, 191 (1963); d) *ibid.* **17**, 2361 (1963); e) *ibid.* **18**, 344 (1964); f) *Planta med.* **14**, 157 (1967); g) *J. Pharmacy Pharmacol.* **22**, 393 (1970).
- [3] a) *L. H. Fikenscher & R. Hegnauer*, *Planta med.* **11**, 348 (1963); b) *idem, ibid.* **11**, 355 (1963); c) *J. W. Wieffering, L. H. Fikenscher & R. Hegnauer*, *Pharmaceut. Weekbl.* **100**, 737 (1965).
- [4] a) *C.-J. Widén*, *Farm. Aikakaust.* **76**, 185 (1967); b) *idem, ibid.* **46**, 233 (1967); c) *idem, ibid.* **77**, 1 (1968); d) *idem*, *Suomen Kemistilehti B41*, 295 (1968); e) *idem*, *Farm. Aikakaust.* **77**, 30 (1968); f) *idem*, *Ann. Acad. Sci. fennicae A IV (Biolog.)* **143**, 1 (1969); g) *C.-J. Widén, V. Sorsa & J. Sarvela*, *Acta bot. fennica* **91**, 1–29 (1970); h) *C.-J. Widén*, *Farm. Aikakaust.* **79** (im Druck); i) *C.-J. Widén & T. Reichstein*, in Vorbereitung.
- [5] *A. v. Hayek*, *Flora von Steiermark* **1**, 36 (1908).
- [6] a) *H. Fischer*, *Ber. dtsh. bot. Ges.* **27**, 495 (1909); b) *ibid.* **37**, 286 (1916); c) *R. de Litardière*, *Cellule* **31**, 255 (1931); d) *W. Döpp*, «Die Apogamie von *Aspidium remotum* Al. Br.» *Planta* **17**, 86 (1932); e) *W. Döpp*, «Cytologische u. genetische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Dryopteris*», *Planta* **29**, 481 (1939); f) *W. Döpp*, «Über *Dryopteris paleacea* Christensen (D. borrieri Newm.)», *Ber. dtsh. bot. Ges.* **59**, 423 (1941).
- [7] *I. Manton*, "Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta", p. 71–79, 187, Cambridge University Press 1950.
- [8] *W. Rothmaler*, «Exkursionsflora von Deutschland IV, Krit. Ergänzungsband», p. 8, Volk u. Wissen, Volkseigener Verlag, Berlin 1963.
- [9] *T. Walker*, *Amer. J. Botany* **48**, 607 (1961).
- [10] *W. Döpp*, «Experimentell erzeugte Bastarde zwischen *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott u. *D. paleacea* (Sw.) C. Chr.», *Planta* **46**, 70 (1955) u. frühere Lit. daselbst.
- [11] *M. Ackermann*, «Beitrag zur biologischen Wertbestimmung unserer einheimischen Farne», *Diss. Univ. Bern* 1946, p. 72–73.
- [12] a) *M. v. Schantz & S. Nikula*, *Planta med.* **10**, 22 (1962); b) *M. v. Schantz & C.-J. Widén*, *Scientia pharmaceut.* (Wien) **35**, 197 (1967).
- [13] *R. Boehm*, *Liebigs Ann. Chem.* **318**, 230 (1901).
- [14] *W. Riedl & R. Mitteldorf*, *Chem. Ber.* **89**, 2595 (1956).
- [15] *A. Aebi, A. L. Kapoor & J. Büchi*, *Helv.* **40**, 569 (1957).
- [16] *R. W. Scora & W. H. Wagner Jr.*, *Amer. Fern J.* **54**, 105 (1964).

260. Konstitution der Bufotoxine

Über Krötengifte, 38. Mitteilung¹⁾von **Hannelore O. Linde-Tempel**

Pharmazeutisches Institut der Universität Basel

(15. X. 70)

Summary. The structure of the so-called 'bufotoxines' has been elucidated by enzymatic degradation.

Die Hauptträger der physiologischen Wirkung des Krötengiftes sind die Bufogenine (Bufadienolide) sowie ihre Ester mit Suberoylarginin, die Bufotoxine²⁾. Die

¹⁾ 37. Mitteilung: [1].

²⁾ Der Ausdruck Bufotoxin wurde von *Chen et al.* [2] als Gruppenbezeichnung für alle Suberoylarginin-Derivate der verschiedenen Bufogenine vorgeschlagen.

meisten der bis heute beschriebenen Bufogenine, die relativ leicht voneinander getrennt und rein gewonnen werden können, sind in ihrer Struktur aufgeklärt. Dies ist bei den Bufotoxinen noch nicht bis in alle Einzelheiten möglich gewesen. – Der bis anhin bestcharakterisierte Suberoylargininester eines Bufogenins, nämlich der des Bufotalins, ist das *Wielandsche* Bufotoxin = Vulgarobufotoxin³⁾ [4], dessen Struktur von *Wieland & Mitarb.* [4] [5] [6] in den Hauptzügen aufgeklärt werden konnte. Da *Wieland & Behringer* [6] glaubten, dass bei vorsichtiger Oxydation des aus *Bufo bufo bufo* gewonnenen Bufotoxins das (C-3)-Keton entsteht, nahmen sie an, dass der Suberoylarginin-Rest mit der (C-14)-HO-Gruppe des Bufotalins verestert ist. Etwas später schlug *Ssemenzow* [7] eine analoge Verknüpfung des Suberoylarginin-Restes mit einer 5-ständigen HO-Gruppe vor. Nachdem die Konstitution des Bufotalins entsprechend **20** aufgeklärt worden war [8], stand der Formelvorschlag von *Wieland & Behringer* [6], wenigstens was die Haftstelle des Suberoylarginin-Restes betrifft, mit **20** im Einklang. Da das aus Bufotoxin erhaltene Keton aber nie näher charakterisiert worden war, haben *Fieser & Fieser* [9] als erste die von *Wieland et al.* postulierte Verknüpfungsstelle (C-14) angezweifelt, zumal die angegebenen physikalischen Daten [6] gut auf die des Ausgangsmaterials [4] passten.

Durch die Vermittlung und tatkräftige Hilfe von Herrn Dr. *R. Zelnik*, wofür ihm auch hier bestens gedankt wird, erhielten wir vom *Instituto Butantan* in São Paulo (Brasilien) das Giftsekret von einigen Hundert Kröten der Spezies *Bufo ictericus Spix 1824 (B. marinus Boulenger 1882)*, das durch Ausdrücken des Paratoidensekretes direkt in 96-proz. Äthanol erhalten worden war⁴⁾. Das ermöglichte uns, die Versuche *Wieland's* [4] zur Isolierung der Bufotoxine am Beispiel der erwähnten südamerikanischen Krötenart nachzuarbeiten. Trotz der uns heute zur Verfügung stehenden neuen Auftrennungsmethoden war es äusserst mühsam, ein einheitliches Bufotoxin zu gewinnen. Um so höher muss deshalb das experimentelle Geschick *Wieland's* und seiner Mitarbeiter bewertet werden, die ohne chromatographische und spektroskopische Hilfsmittel das Vulgarobufotoxin isolieren konnten.

Durch wiederholte Chromatographie der rohen Sekrete (s. exper. Teil) konnte nur ein Bufotoxin, nämlich Marinobufotoxin (**5**)⁵⁾, rein erhalten werden, während die Resibufogenin (**4**), Bufalin (**12**), Telocinobufagin (**16**), Bufotalin (**20**) und Hellebrigenin (**24**) entsprechenden Toxine **1**, **9**, **13**, **17** und **21** nur indirekt nachgewiesen bzw. nach partiellem enzymatischen Abbau z.T. als Methyl- oder Äthylester der Korksäure-halbester kristallin erhalten werden konnten⁶⁾.

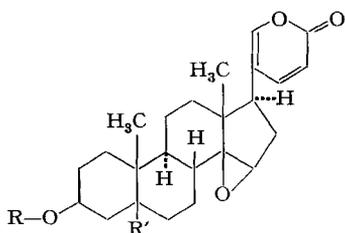
Wieland et al. hatten angenommen, dass in den Bufotoxinen die Korksäure das Bindeglied zwischen dem Bufogenin und dem Arginin bildet [4], wobei die stark basische Guanidinogruppe endständig, d.h. frei ist [6]. Dass diese Annahme richtig ist, liess sich durch Überführung von **5** mittels Acetylaceton und Diazomethan in das

³⁾ Nomenklaturvorschlag von *Chen et al.* [3].

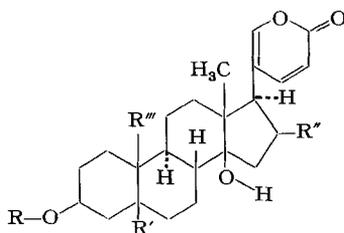
⁴⁾ Wird das Paratoidensekret einfach an der Luft getrocknet, so werden die Bufotoxine durch die im Rohgift enthaltenen Enzyme gespalten (vgl. hierzu [4]).

⁵⁾ Dieses Bufotoxin war von *Jensen & Chen* [10] aus dem Giftsekret von *B. marinus* isoliert worden. Eine kleine Probe dieses nicht ganz einheitlichen Produktes hat uns Herr Prof. *T. Reichstein*, Basel, freundlicherweise für Vergleichszwecke zur Verfügung gestellt.

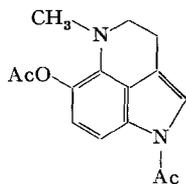
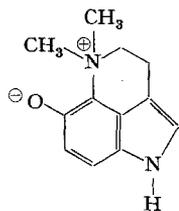
⁶⁾ Die in dieser Arbeit erwähnten Korksäure-methylester der Genine **4**, **16** und **20** waren nach DC. [System Chloroform-Äthanol-(98:2)] mit den später von *Höriger et al.* [14] partialsynthetisch bereiteten Estern identisch.



- 1** R = Sub-Arg, R' = H
2 R = Sub-äthyl, R' = H
 F.: 104-108°
3 R = Sub-methyl, R' = H
 F.: 115-118°
4 R = H, R' = H
5 R = Sub-Arg, R' = OH
 F.: 174-179°
6 R = Sub-äthyl, R' = OH
 F.: 138-142°
7 R = Sub-methyl, R' = OH
 F.: 103-112°
8 R = H, R' = OH
 F.: 218-222°

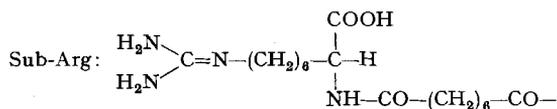
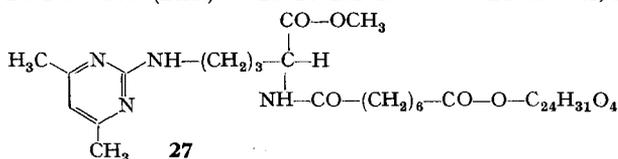


- 9** R = Sub-Arg, R' = R'' = H, R''' = CH₃
10 R = Sub-äthyl, R' = R'' = H, R''' = CH₃
 F.: 128-138°
11 R = Sub-methyl, R' = R'' = H, R''' = CH₃
12 R = R' = R'' = H, R''' = CH₃
13 R = Sub-Arg, R' = OH, R'' = H,
 R''' = CH₃
14 R = Sub-äthyl, R' = OH, R'' = H,
 R''' = CH₃ nicht isoliert
15 R = Sub-methyl, R' = OH, R'' = H,
 R''' = CH₃
16 R = H, R' = OH, R'' = H, R''' = CH₃
 F.: 150-156°/200-204°
17 R = Sub-Arg, R' = H, R'' = OAc,
 R''' = CH₃
18 R = Sub-äthyl, R' = H, R'' = OAc,
 R''' = CH₃
19 R = Sub-methyl, R' = H, R'' = OAc,
 R''' = CH₃
 F.: 153-170°
20 R = R' = H, R'' = OAc, R''' = CH₃
21 R = Sub-Arg, R' = OH, R'' = H,
 R''' = CHO
22 R = Sub-äthyl, R' = OH, R'' = H,
 R''' = CHO nicht isoliert
23 R = Sub-methyl, R' = OH, R'' = H,
 R''' = CHO
24 R = H, R' = OH, R'' = H, R''' = CHO



25 F.: ~240° (Zers.)

26 F.: 132-134°



Sub-äthyl: C₂H₅-O-CO-(CH₂)₆-CO-

Sub-methyl: CH₃-O-CO-(CH₂)₆-CO-

Pyrimidinderivat **27** beweisen. Damit stand gleichzeitig auch ein für die Massenspektroskopie geeignetes Derivat zur Verfügung⁷⁾, bei dem das M⁺ sich mit 790 = C₄₄H₆₂N₄O₉ ermitteln liess, was für Marinobufotoxin (**5**) selbst die Formel C₃₈H₅₆N₄O₉ ergibt, die auch durch Verbrennungsanalyse bestätigt wurde.

⁷⁾ Herrn Dr. W. Vetter, F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, danken wir bestens für die Mitteilung dieser Methode noch vor ihrer Veröffentlichung [11].

Die Reihenfolge der Verknüpfung von Arginin, Korksäure und Bufogenin hofften wir durch stufenweisen enzymatischen Abbau von **5** mit Hilfe des im Giftsekret enthaltenen Fermentes bzw. durch Interpretation des Massen- und des NMR.-Spektrums ermitteln zu können. Das uns zur Verfügung stehende Giftsekret war – wie schon gesagt – bei der Gewinnung in 96-proz. Äthanol aufgefangen worden, wobei sich ein weissgrauer Niederschlag gebildet hatte, in dem wir das spezifische, die Bufotoxine spaltende Ferment vermuteten. Dieser Niederschlag wurde analog wie Strophanthobiase [12] durch Aufnehmen in 1-proz. NaCl-Lösung und Fällen mit Äthanol gereinigt, erwies sich aber als inaktiv. Hingegen gelang es, **5** mit einem Pankreaslipase-Präparat⁸⁾ zu spalten, und zwar unter Bildung von Marinobufagin-korksäurehalb-ester, der als Äthyl-⁹⁾ bzw. Methylester (**6** bzw. **7**) rein gewonnen werden konnte, und von freiem Marinobufagin (**8**). Die Struktur von **6** und **7** ist durch Massen-, UV.- oder NMR.-Spektren gesichert. Damit verblieb nur noch, die Haftstelle der Korksäure am Bufogenin zu bestimmen. Hierzu wurden 3-O-Acetyl-marinobufagin, Bufotalin (**20**) und Acetylmartinobufotoxin enzymatisch hydrolysiert. Dabei blieben die beiden ersteren Stoffe unverändert, während aus Acetylmartinobufotoxin Marinobufagin (**8**), aber kein 3-O-Acetyl-marinobufagin gebildet wurde. Damit ist die Verknüpfung des Suberoylarginin-Restes über C-3 in **5** bewiesen.

Auch die Interpretation der Massen- und NMR.-Spektren führte zum gleichen Ergebnis. Im MS. des oben aus **5** erhaltenen Pyrimidinderivates **27** erscheint u. a. ein Ion mit $m/e = 539 = C_{32}H_{43}O_7$ (genau vermessen). Es entsteht durch Bruch der Amid-Bindung zwischen Korksäure und Arginin. Dabei bleibt der Steroidteil mit der Korksäure verbunden; die Aminosäure muss daher endständig sein. Die Verknüpfungsstelle der Korksäure mit Marinobufagin lässt sich aus dem NMR.-Spektrum von **6** ableiten, das das typische breite «Singulett» des C-3 α -H der AB *cis*-verknüpften Steroide bei etwa 5,22 ppm, also verestert (!), enthält.

Dass auch beim Vulgarobufotoxin der Suberoylarginin-Rest an C-3 haftet, konnte ebenfalls auf enzymatischem Wege bewiesen werden. Herr Prof. T. Reichstein hatte die grosse Freundlichkeit, uns ein Bufotoxin-Präparat, das in seinem Laboratorium aus dem Giftsekret von *Bufo bufo bufo* isoliert worden war [13], für enzymatische Abbauprobe zu überlassen. Aus den erhaltenen sauren Anteilen wurde nach Veresterung mit ätherischem Diazomethan der Methylester **19** des 3-O-Suberoylbufotalins kristallin gewonnen. Dieser war identisch mit einem später durch Umsetzen von Bufotalin mit Korksäureanhydrid und anschliessende Methylierung hergestellten Vergleichspräparat [14]⁸⁾.

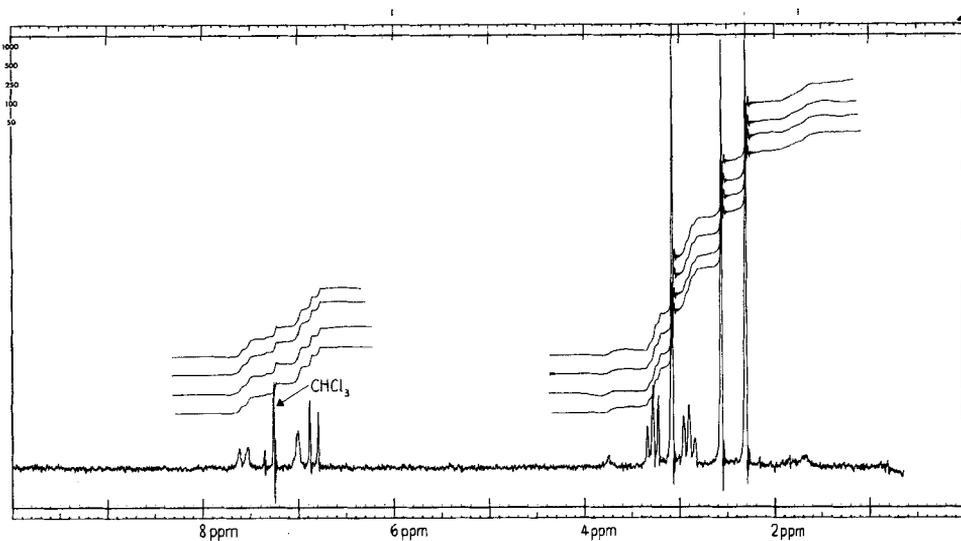
Wie oben ausgeführt, wurden ausser **5** keine weiteren Bufotoxine rein gewonnen. Hingegen konnten in enzymatisch abgebauten Bufotoxin-Gemischen die Äthyl- bzw. Methylester der Korksäurehalbester einer Reihe von Bufogeninen (siehe oben) nachgewiesen bzw. daraus isoliert werden. Der Umstand, dass bei der DC.-Analyse ein bestimmtes Bufogenin, seine Korksäureester sowie das dazugehörige Toxin nach Besprühen mit konz. H₂SO₄-Äthanol-(1:1) und Erhitzen dieselben Färbungen zeigen, erleichterte den Nachweis bzw. die Identifizierung und das Trennungsverfahren sehr.

⁸⁾ Wir danken Herrn Dr. O. Klemm von der Schweiz. Ferment AG. in Basel bestens für die Überlassung dieses Präparates.

⁹⁾ Die Fermentierungslösungen enthielten jeweils rund 13% Äthanol.

Mangels Substanz haben wir darauf verzichtet, auch bei den übrigen Bufogenin-korksäureestern die Verknüpfungsstelle exakt zu ermitteln. Es dürfte aber kaum ein Zweifel darüber bestehen, dass bei allen Bufotoxinen das Suberoylarginin wie bei **5** mit der HO-Gruppe an C-3 verestert ist, d. h. die gleiche Haftstelle am Steroidskelett einnimmt wie die Zucker in den Steroid-Glykosiden, obwohl in letzter Zeit hier Ausnahmen beobachtet wurden [15].

Die Feststellung der Haftstelle des Suberoylarginin-Restes war bereits vor einiger Zeit bekanntgegeben worden [16], und dieses Ergebnis wurde kürzlich von japanischen Autoren bestätigt [17], die aus *Ch'an Su* die sauren 3-O-Suberoylester des



NMR.-Spektrum (100 MHz) von **26**

Resibufogenins, Cinobufagins und Bufalins erhielten und als Methylester charakterisierten, die sich als identisch mit den entsprechenden auf synthetischem Wege bereiteten Estern erwiesen. Über die Isolierung einer Reihe weiterer Korksäurehalbestere von Bufogeninen aus *Ch'an Su* wurde bereits in einer Mitteilung dieser Reihe berichtet [14].

Vor einigen Jahren ist das Dehydrobufotenin, das *Wieland* & Mitarb. erstmals [18] aus dem Giftsekret der japanischen Kröte isoliert und als ein 5-Hydroxy-N,N-dimethyltryptamin (mit Doppelbindung in der aliphatischen Seitenkette) angesehen haben [19], von verschiedenen Arbeitsgruppen zur selben Zeit als cyclisches Betain entsprechend Formel **25** erkannt worden [20] [21]. Da wir **25** im Laufe dieser Untersuchungen isolieren konnten, haben wir diese «Krötenbase» in ihre Diacetylverbindung übergeführt; die dafür schon vorgeschlagene Formel **26** [20] wird nun durch das in der Figur wiedergegebene NMR.-Spektrum bewiesen.

Die Massen- und NMR.-Spektren wurden in den Laboratorien der *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.*, Basel, aufgenommen. Den Herren Dres. *W. Arnold*, *A. Dirscherl*, *G. Englert* und *W. Vetter* sowie den Herren *P. Casagrande*, *B. Meier* und *W. Meister* sei auch hier bestens für die Elementaranalyse

bzw. für die Aufnahme und die Hilfe bei der Interpretation der Spektren gedankt. – Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Alle *Smp.* wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze bis $200^\circ \pm 2^\circ$, darüber ca. $\pm 3^\circ$.

Abkürzungen: DC. = Dünnschicht bzw. Dünnschichtchromatographie, Fr. = Fraktion(en), SiO_2 = Kiesegel (zur Säulenchromatographie «Merck» 0,05–0,2 mm, zur DC. «Camag» mit 5% CaSO_4), M^+ = Molekel-Ion, ML. = Mutterlaugen(rückstände).

Chromatographie: Als Lösungsmittelsystem für die DC. (analytisch und präparativ) wurde, wenn nichts anderes angegeben, jeweils das System benutzt, das auch bei der Säulenchromatographie der entsprechenden Gemische verwendet wurde. Die angegebenen Verhältniszahlen für Lösungsmittelgemische bedeuten Volumenteile. Zur Sichtbarmachung der gewanderten Substanzen wurde erst mit konz. H_2SO_4 -Äthanol (1:1) besprüht, anschliessend auf etwa 100–120° erhitzt.

Nachweis des Argininrestes: Sa-positiv bedeutet: Die Lösung der Substanz, auf Filterpapier aufgetragen, wurde mit *Sakaguchi*-Reagens I (40 mg α -Naphthol, 20 ml Äthanol, 16 g Harnstoff, 84 ml Wasser) besprüht und im heissen Luftstrom getrocknet. Hierauf wurde mit *Sakaguchi*-Reagens II (5 g NaOH, 95 ml Wasser, 0,66 ml Br_2) beseprüht, wobei sich ein rosaroter Fleck bildete.

Analytisches: Die Molekulargewichte wurden massenspektroskopisch mit dem MS 9 der Firma AEI bei 70 eV und mit Direkteinlass bestimmt. Die NMR.-Spektren sind in CDCl_3 mit Tetramethylsilan (= 0 ppm) als internem Standard aufgenommen. Die UV.-Spektren sind in 96-proz. Äthanol aufgenommen und in nm (ϵ) angegeben.

Auftrennung der mit Äthanol konservierten rohen Giftsekrete. – *Vorreinigung.* Es standen 3 alkoholische Suspensionen zur Verfügung, die das Giftsekret von 100, 200 bzw. 400 Kröten enthielten. Sie wurden filtriert. (Der Rückstand der ersten Suspension wog nach dem Waschen mit Äthanol und Trocknen 8,2 g. Er gab mit 1-proz. NaCl eine opalisierende Lösung, die filtriert und mit Äthanol versetzt wurde. Der dabei gebildete Niederschlag wies keine nennenswerte Bufotoxin-spaltende Wirkung auf.) Die filtrierten alkoholischen Lösungen, gesondert im Vakuum bei 35° Badtemperatur eingedampft, ergaben 9,0 g, 12,8 g bzw. 28,0 g Rückstände. Diese wurden einzeln wie folgt aufgetrennt. Beispiel: 12,8 g wurden in Methanol-Chloroform gelöst; die Lösung wurde an 300 g *Hyflo Super Cel* absorbiert, diese Masse mit 1000 g Seesand (mit Chloroform und Methanol gewaschen) vermischt, bei 50° getrocknet und im Chromatographierohr nach dem Durchlaufverfahren mit den folgenden Lösungsmitteln extrahiert: 2 l Äther: 917 mg Rückstand, Sa-negativ; 1 l Äther-Chloroform-(4:1): 73 mg Rückstand, Sa-negativ; 2,5 l Äther-Chloroform-(1:1): 680 mg Rückstand, Sa-negativ; 3 l Chloroform und 2 l Chloroform-Methanol-(9:1): total 9,88 g Rückstand, Sa-positiv. – Sie Sa-positiven Rückstände der einzelnen Chargen (7,47 g, 9,88 g und 20,85 g) wurden vereinigt (total 38,20 g) und in Portionen weiter aufgetrennt.

Chromatographische Auftrennung der Sa-positiven vorgereinigten Anteile (38,2 g). – *Chromatographie 1.* 8,2 g wurden an 750 g SiO_2 mit Chloroform-Methanol-Wasser-(80:20:2,5) aufgetrennt. Durchlaufgeschwindigkeit: 55 ml/2 Std., Säule $180 \times 3,5$ cm. 0–1250 ml: 1560 mg, Sa-negativ. 1251–2000 ml: 195 mg, Sa-positiv, siehe Chromatographie 4. 2001–3600 ml: 2400 mg, Sa-positiv, siehe Chromatographie 2. 3601–6900 ml: 970 mg (nicht untersucht).

Chromatographie 2. Die 2400 mg Sa-positiven Anteile aus Chromatographie 1 wurden an 750 g SiO_2 mit Aceton-Chloroform-Methanol-Wasser-(6:2:1:1) aufgetrennt. Durchlaufgeschwindigkeit: 60 ml/20 Min., Säule $180 \times 3,5$ cm. 0–2000 ml: verworfen. 2001–3600 ml: 240 mg Gemisch, enthielt nach DC. **1** und **9**. 3601–8100 ml: 1970 mg Gemisch, nach DC. zur Hauptsache **5** enthaltend, siehe Chromatographie 3.

Chromatographie 3: Isolierung von 5 und Bereitung von 27. Die 1970 mg Gemisch aus Chromatographie 2 wurden an 750 g SiO_2 mit Chloroform-Methanol-Wasser-(80:20:2,5) aufgetrennt. Durchlaufgeschwindigkeit: 20 ml/Std., Fr. zu 20 ml, Säule $180 \times 3,5$ cm. Fr. 1–197: 30 mg, verworfen. Fr. 198–215: 270 mg Gemisch, aus 80-proz. Äthanol 190 mg **5**, das nach DC. noch etwas **1** enthielt. Fr. 216–274: 920 mg, aus 80-proz. Äthanol 570 mg reines kristallines **5** vom *Smp.* 174–179°; $[\alpha]_D^{24} = +24^\circ \pm 2^\circ$ [in Chloroform-Methanol-(1:1)]; λ_{max} 300 (5450).

$\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_9$ (712) Ber. C 64,02 H 7,92 N 7,86% Gef. C 64,19 H 7,91 N 7,90%

Fr. 275–292: 110 mg, aus 80-proz. Äthanol 40 mg Kristalle, nach DC. Gemenge von **5** und **13**.
Fr. 293–500: 268 mg, nach DC. Gemisch aus **5**, **13** und **21**.

100 mg **5** wurden in 4 ml einer filtrierten Mischung aus Methanol, gesättigter wässriger KHCO_3 -Lösung und Acetylaceton (1:1:2) 16 Std. auf 50° erwärmt. Nach dieser Zeit war die Lösung nur noch schwach Sa-positiv. Sie wurde 6mal mit Chloroform ausgeschüttelt, und die vereinigten Chloroformauszüge bei 20°/0,1 Torr eingedampft: 110 mg. Diese wurden in wenig Methanol gelöst, mit ätherischer CH_2N_2 -Lösung versetzt, im Vakuum zur Trockene gebracht und an 75 g SiO_2 (Säule 70 × 2,5 cm) mit Chloroform-Isopropanol-(9:1) chromatographiert. Durchlaufgeschwindigkeit: 15 ml/Std., Fr. zu 15 ml. Die Fr. 13–18 gaben 40 mg Rückstand, der 2mal durch präparative DC. mit dem System Essigsäure-äthylester (mit Wasser gesättigt) und 1mal mit dem System Aceton-Benzol-Petroläther-(1:1:1) von den hauptsächlich unpolaren Nebenprodukten befreit wurde. Es wurden 12 mg amorphes **27** erhalten. $M^+ = 790 = \text{C}_{44}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{O}_6$.

Chromatographie 4. Die Sa-positiven 195 mg der Chromatographie 1 sowie 80 mg ML. der Kristalle aus Fr. 198–215 von Chromatographie 3 wurden vereinigt und an 200 g SiO_2 mit Chloroform-Methanol-Wasser-(80:20:2,5) chromatographiert. Durchlaufgeschwindigkeit: 15 ml/Std., Fr. zu 15 ml, Säule 100 × 2,6 cm. Fr. 1–16: verworfen. Fr. 17–37: 100 mg, nach DC. **1** neben wenig **5**. Fr. 38–70: 130 mg Gemisch, nach DC. **1** und **5** (etwa 1:1). Fr. 71–80: 18 mg Gemisch, nach DC. **5** neben wenig **1**.

Chromatographie 5: Isolierung von 25. 9,88 g vorgereinigtes Sa-positives Gemisch wurden an 750 g SiO_2 mit Chloroform-Methanol-Aceton-Wasser-konz. NH_3 -Lösung-(20:10:60:10:2) chromatographiert. Durchlaufgeschwindigkeit 30 ml/30 Min., Fr. zu 30 ml. Säule 180 × 3,5 cm. Fr. 1–25 verworfen. Die Fr. 26–81 gaben beim Eindampfen 75 mg kristallines **25**, Smp. ca. 240° (Zers.). Die ML. waren Sa-negativ und wogen 1,1 g. Die Fr. 82–94 wurden nicht weiter untersucht. Fr. 95–157: 5,5 g Sa-positives Gemisch, siehe Chromatographie 6. Fr. 158–192: 3,37 g Sa-positives Gemisch, siehe Chromatographie 7. Die weiteren Eluate wurden nicht weiter untersucht.

Chromatographie 6: Isolierung von 25 und 5. Die 5,5 g Gemisch aus Chromatographie 5/Fr. 95–157 wurden an 750 g SiO_2 mit Chloroform-Methanol-Wasser-(80:20:2,5) chromatographiert. Durchlaufgeschwindigkeit 20 ml/Std., Fr. zu 20 ml, Säule 180 × 3,5 cm. Fr. 1–39 wurden verworfen. Fr. 40–53: 430 mg, Sa-negativ. Fr. 54–144: 210 mg, nicht weiter untersucht. Fr. 145–151: 50 mg, Sa-positiv. Aus den Fr. 152–179 wurden beim Eindampfen 82 mg kristallisiertes **25** erhalten und 1,0 g ML., Sa-positiv. Fr. 180–186: 240 mg, Sa-positiv. Fr. 187–210: 800 mg, Sa-positiv; aus 80-proz. Äthanol 460 mg kristallisiertes **5**. Fr. 211–380: 1,85 g, Sa-positiv, nicht weiter untersucht.

Chromatographie 7. 3,37 g Sa-positives Material der Chromatographie 5/Fr. 158–192 wurden an 750 g SiO_2 mit Chloroform-Methanol-Aceton-Wasser-konz. NH_3 -Lösung (20:10:60:10:2) chromatographiert. Durchlaufgeschwindigkeit 25 ml/30 Min., Fr. zu 25 ml, Säule 180 × 3,5 cm. Fr. 1–52: 1,32 g, Sa-negativ, nicht weiter untersucht. Fr. 53–93: 410 mg, Sa-positiv, nicht weiter untersucht. Fr. 94–117: 220 mg, Sa-positiv, siehe Chromatographie 8. Die Fr. 118–159 (290 mg, Sa-positiv) und 160–230 (450 mg, Sa-negativ) wurden nicht weiter untersucht.

Chromatographie 8. Die Eindampfrückstände der Fr. 94–117 von Chromatographie 7 wurden an 70 g SiO_2 mit Chloroform-Methanol-Wasser-(80:20:2,5) chromatographiert. Durchlaufgeschwindigkeit 15 ml/30 Min., Fr. zu 15 ml, Säule 70 × 2,5 cm. Fr. 1–40: 115 mg, Sa-negativ, nicht weiter untersucht. Fr. 41–59: 20 mg, Sa-positiv, nach DC. **5**. Fr. 60–78, 24 mg: Sa-positiv, nach DC. **5** und **13** (etwa 1:1). Fr. 79–97: 27 mg, Sa-positiv, nach DC. **13** und wenig **5**. Fr. 98–115: 17 mg, Sa-positiv, nicht weiter untersucht.

Enzymatischer Abbau der Bufotoxine und Beschreibung der isolierten Substanzen. –

Für diesen Abbau wurden 5 mg Substanz, in 1 ml 80-proz. Äthanol gelöst, mit einer Suspension von 5 mg Pankreaslipase⁶⁾ in 5 ml 1-proz. NaCl-Lösung versetzt und 18 Std. bei 37° gerührt. Hierauf wurde mit 2N HCl angesäuert und 3mal mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden jeweils 1mal mit 2N HCl, 2mal mit 2N Na_2CO_3 -Lösung, 1mal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft: Neutralteil = Bufogenin und Bufogenin-korksäure-äthylester. Die alkalischen Auszüge wurden mit 2N HCl angesäuert und 3mal mit Chloroform ausgeschüttelt: saure Anteile = Bufogenin-korksäurehalbesther.

2 und 3 aus rohem 1. 90 mg **1**, das nach DC. wenig **5** enthält (siehe Chromatographie 4, Fr. 17–37), gaben nach Fermentierung 64 mg neutrale und 20 mg saure Anteile. Die neutralen Anteile wurden an 50 g SiO_2 mit Essigsäureäthylester-Chloroform-Petroläther-(70:15:15) aufgetrennt,

wobei 39 mg eines Gemisches erhalten wurden, das **2** angereichert enthielt. **2** konnte durch präparative DC. (Schichtdicke 2 mm, mit 0,5% Leuchtpigment ZS Super «Riedel de Haën») rein erhalten werden. Aus Methanol-Äther Kristalle vom Smp. 104–108°. $M^+ = 568 = C_{34}H_{48}O_7$. – Die sauren Anteile (20 mg) wurden in einigen Tropfen Methanol gelöst und mit ätherischer Diazomethanlösung verestert. Nach Vortrennung des rohen Esters **3** an 30 g SiO_2 mit Essigsäureäthylester-Chloroform-Petroläther-(70:15:15) und anschliessender präparativer DC. konnten 10 mg **3** (aus Methanol-Äther) vom Smp. 115–118° (Sint. bei 57°) isoliert werden. $M^+ = 554 = C_{33}H_{46}O_7$.

Nachweis von 12 und 4, 10 und 2 sowie 11 und 3 aus einem Gemisch von 1 und 9. 10 mg des Gemisches von **1** und **9** aus Chromatographie **2** wurden fermentiert. Der Neutralteil enthielt nach DC. neben Bufalin (**12**) und Resibufogenin (**4**) [System Essigsäureäthylester-Petroläther-(2:1)] die **12** und **4** entsprechenden Korksäure-äthylester **10** (siehe weiter unten) und **2** [System Essigsäureäthylester-Petroläther-(1:1)]. – Die sauren Anteile wurden mit Methanol verflüssigt, mit ätherischer CH_2N_2 -Lösung methyliert und durch präparative DC. [Essigsäureäthylester-Chloroform-Petroläther-(70:15:15)] aufgetrennt. Es konnte dabei nur amorphes **11** isoliert werden, das nach DC. und MS. noch **3** enthielt. $M^+ = 556 = C_{33}H_{46}O_7$.

10, 6 und 8 sowie 7 aus Gemisch von 9 und 5. 580 mg ML. aus den Fr. 216–274 und 187–210 der Chromatographien **3** bzw. **6** wurden fermentiert. Den Neutralteil (317 mg) chromatographierte man an 200 g SiO_2 ; Eluierungsmittel: Essigsäureäthylester-Chloroform-Petroläther-(70:15:15) (Säule 100 × 2,0 cm). Fr. 1–36: nicht weiter untersucht. Fr. 37–38: 12 mg, aus Aceton 6 mg **10** vom Smp. 128–138°; λ_{max} 300 ($\epsilon = 5500$); $M^+ = 570 = C_{34}H_{50}O_7$. Fr. 39: 6 mg Gemisch, nicht weiter untersucht. Fr. 40–44: 125 mg, aus Aceton-Äther 76 mg Kristalle (Prismen) von **6** vom Smp. 138–142°; λ_{max} 300 ($\epsilon = 5800$); $[\alpha]_D^{24} = +23^\circ \pm 2^\circ$ (in Chloroform); $M^+ = 584 = C_{34}H_{48}O_8$; NMR.: C(3)- α H = 5,22 ppm, C(18)-3H = 0,78 ppm, C(19)-3H = 1,01 ppm, Äthyl = 4,10 ppm (Quartett 7 Hz = CH_2) und 1,23 ppm (Triplet 7 Hz = CH_3). Fr. 45–98: kein Rückstand. Fr. 99–128: 74 mg, aus Chloroform-Aceton-Äther 40 mg **8** vom Smp. 218–222° (Sintern ab 212°), keine Smp.-Depression mit authentischem **8** [22]. – Die sauren Anteile der Fermentierung (135 mg) wurden an 80 g SiO_2 vorgetrennt. 1800 ml Essigsäureäthylester-Petroläther-Chloroform-(70:15:15) eluierten total 8 mg Substanz (verworfen). 2800 ml Chloroform-Isopropanol-(9:1) lösten 96 mg Gemisch von der Säule; 60 mg davon wurden in Methanol-Äther mit überschüssigem ätherischem CH_2N_2 methyliert und an 50 g SiO_2 mit Essigsäureäthylester-Petroläther-Chloroform-(70:15:15) chromatographiert (Säule 70 × 2,5 cm), Durchlaufgeschwindigkeit 5 ml/30 Min., Fr. zu 5 ml. Fr. 1–23: 9 mg Gemisch, nicht weiter untersucht. Fr. 24–27: 29 mg, aus Aceton-Äther 12 mg Kristalle von **7**, Smp. 103–112°; λ_{max} 300 ($\epsilon = 5150$); $M^+ = 570 = C_{33}H_{46}O_8$.

Enzymatischer Abbau von Acetylmavinobufotoxin, 3-O-Acetyl-marinobufagin und Bufotalin (20). Je 5 mg rohes Acetylmavinobufotoxin (5 mg **5** in 20 Tropfen Pyridin und 5 Tropfen Essigsäureanhydrid **16** Std. bei 20° acetyliert, nach DC. [Chloroform-Isopropanol-(9:1) und Essigsäureäthylester-Petroläther-Chloroform-(70:15:15)] einheitlich und frei von **5**), 3-O-Acetyl-marinobufagin und Bufotalin wurden fermentiert. Dabei blieben die beiden zuletzt genannten Bufadienolide unverändert, während im Reaktionsgemisch von Acetylmavinobufotoxin durch DC. (mit obigen Systemen) Marinobufagin (**8**), aber kein 3-O-Acetyl-marinobufagin nachweisbar war.

Enzymatischer Abbau von rohem Telocinobufotoxin 13. 27 mg Substanz aus den Fr. 79–97 der Chromatographie **8** wurden fermentiert. Den Neutralteil, der nach DC. u. a. aus Marinobufagin (**8**) und vor allem Telocinobufagin (**16**) bestand, trennte man durch präparative DC. [Essigsäureäthylester-Chloroform-Petroläther-(70:15:15)]. Dabei konnte **16** in Kristallen erhalten werden. Smp. 150–156°/200–204° (aus Chloroform-Äther); Misch-Smp. mit authentischem Telocinobufagin [23] (Smp. 146–148°/200–205°): 147–156°/200–206°. – Die sauren Anteile trennte man nach der Veresterung mit ätherischem CH_2N_2 durch präparative DC., zunächst im System Essigsäureäthylester-Chloroform-Petroläther-(70:15:15), dann im System Essigsäureäthylester-Petroläther-(2:1). Der Telocinobufagyl-methyl-korksäureester (**15**) (unrein) blieb amorph. $M^+ = 572 = C_{33}H_{48}O_8$.

20, 18 und 19 durch enzymatischen Abbau von Vulgarobufotoxin (17) [13]. 10 mg **17** (Präparat Prof. Reichstein) wurden fermentiert. Der Neutralteil enthielt nach DC. [Essigsäureäthylester-Petroläther-(2:1)] Bufotalin (**20**) und [Essigsäureäthylester-Petroläther-(1:1)] Bufotalyl-äthyl-korksäureester (**18**). **18** konnte durch präparative DC. [Essigsäureäthylester-Petroläther-(1:1)] rein erhalten werden, blieb aber amorph. $M^+ = 628 = C_{36}H_{52}O_9$. – Die sauren Anteile wurden in wenig Methanol gelöst, mit ätherischem CH_2N_2 verestert, und **19** durch präparative DC. [Essigsäure-

äthylester-Petroläther-(1:1)] isoliert. Der Rückstand gab aus Aceton-Äther Kristalle von **19**, Smp. 153–170°; $M^+ = 614 = C_{35}H_{50}O_9$.

Enzymatischer Abbau des «Rohbufotoxins» (Präparat Prof. T. Reichstein). 15 mg «Rohbufotoxin» (nach DC. [Chloroform-Methanol-Wasser-(80:20:2,5)] aus **13** und **21** nebst weiteren Substanzen bestehend) wurden fermentiert. Aus dem Neutralteil konnte durch präparative DC. [Essigsäureäthylester-Petroläther-(2:1)] amorphes Hellebrigenin (**24**), das noch etwas Telocinobufagin (**16**) enthielt, isoliert werden. $M^+ = 416 = C_{24}H_{32}O_6$. Die sauren Anteile wurden in wenig Methanol mit ätherischem CH_2N_2 verestert und durch präparative DC. [Essigsäureäthylester-Petroläther-(1:1)] aufgetrennt. Der dabei isolierte amorphe Hellebrigenyl-methyl-korksäureester (**23**) enthielt nach DC. [Essigsäureäthylester-Petroläther-(1:1)] und MS. noch etwas Telocinobufoginyl-methyl-korksäureester (**15**). $M^+ = 586 = C_{33}H_{46}O_9$.

25. Beim Eindampfen der vereinigten Fr. 26–81 von Chromatographie 5 fielen 75 mg Kristalle aus, die bei etwa 240° (Zers.) schmolzen, in Chloroform, Methanol, 2N NaOH, 2N HCl unlöslich waren, in 80-proz. Äthanol aber in Lösung gebracht werden konnten. λ_{max} 225 (25250); 295 (4580) (siehe hierzu [24]). $M^+ = 202 = C_{12}H_{14}N_2O$.

Acetylverbindung 26 aus **25**. 30 mg **25** wurden in 1 ml Pyridin und 0,7 ml Essigsäureanhydrid 50 Min. auf 140° erhitzt. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, mit 2N HCl und Wasser gewaschen (!), über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum verdampft. Der Rückstand gab aus Aceton-Äther leicht zersetzliche Kristalle von **26**, die nach DC. [Essigsäureäthylester-Petroläther-(1:1)] einheitlich waren. Smp. 132–134° (Smp. nach [24]: 140–141°). λ_{max} 215 (21700); 240 (25100); 273 (8400); 333 (7450). NMR.-Spektrum siehe Figur. $M^+ = 288 = C_{15}H_{16}N_2O_4$.

Pikrat von 25. 10 mg **25** wurden in 80-proz. Äthanol gelöst und mit einer gesättigten, salzsäuren, wässrigen Pikrinsäurelösung versetzt. Beim Einengen der Lösung fielen gelbe Kristalle des Dehydrobufoteninpikrates aus. Smp. 92–106°/180–186° (Smp. nach [19]: 186°).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 37. Mitteilung: N. Höriger, D. Živanov, H. H. A. Linde & K. Meyer, *Helv.* 53, 2051 (1970).
- [2] K. K. Chen, H. Jensen & A. L. Chen, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 29, 907 (1931–1932).
- [3] K. K. Chen, H. Jensen & A. L. Chen, *J. Pharmacol. exp. Therapeut.* 47, 307 (1933).
- [4] H. Wieland & R. Alles, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 55, 1789 (1922).
- [5] H. Wieland, G. Hesse & R. Hüttel, *Liebigs Ann. Chem.* 524, 203 (1936).
- [6] H. Wieland & H. Behringer, *Liebigs Ann. Chem.* 549, 209 (1941).
- [7] A. Ssemenzow, *Pharmaz. J. (Russisch)* 12, 19 (1939); *Chem. Zbl.* 1940, II, 773; s. auch *Chem. Abstr.* 35, 6273^b (1941).
- [8] K. Meyer, *Helv.* 32, 1993 (1949).
- [9] L. F. Fieser & M. Fieser, «Steroids», S. 792, Reinhold Publishing Comp., New York 1959.
- [10] H. Jensen & K. K. Chen, *J. biol. Chemistry* 87, 755 (1930).
- [11] H. Vetter-Diechtl, W. Vetter, W. Richter & K. Biemann, *Experientia* 24, 340 (1968).
- [12] W. A. Jacobs & A. Hoffmann, *J. biol. Chemistry* 69, 153 (1926); A. Stoll & J. Renz, *Enzymologia* 7, 362 (1939); J. Schmutz & T. Reichstein, *Pharmac. Acta Helv.* 22, 359 (1947), s. bes. S. 370.
- [13] H. R. Urscheler, Ch. Tamm & T. Reichstein, *Helv.* 38, 883 (1955).
- [14] N. Höriger, D. Živanov, H. H. A. Linde & K. Meyer, *Helv.* 53, 1993 (1970).
- [15] H. Ripperger & K. Schreiber, *Chem. Ber.* 101, 2450 (1968); weitere Literatur siehe daselbst.
- [16] K. Meyer, *Memorias Instituto Butantan, International Symposium on Animal Venoms, São Paulo, Brazil, 1966, Fasc. II, p. 433.*
- [17] Y. Kamano, H. Yamamoto, Y. Tanaka & M. Komatsu, *Tetrahedron Letters* 1968, 5673.
- [18] H. Wieland & F. Voche, *Liebigs Ann. Chem.* 481, 215 (1930).
- [19] H. Wieland & Th. Wieland, *Liebigs Ann. Chem.* 528, 234 (1937).
- [20] B. Robinson & G. F. Smith, A. H. Jackson & D. Shaw, B. Frydman & V. Deulofeu, *Proc. chem. Soc.* 1961, 310.
- [21] F. Märki, A. V. Robertson & B. Witkop, *J. Amer. chem. Soc.* 83, 3341 (1961).
- [22] W. E. Thiessen, *Chemistry & Ind.* 1958, 440; H. Schröter, R. Rees & K. Meyer, *Helv.* 42, 1385 (1959), sowie ältere Literatur daselbst.
- [23] K. Meyer, *Helv.* 32, 1593 (1949).
- [24] B. Witkop, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 2873 (1956), bes. S. 2878.