

42. Die toxischen und sedierend wirkenden Bufadienolide von *Kalanchoe daigremontiana* HAMET et PERR.

von Hildebert Wagner*, Hermann Lotter und Manfred Fischer¹⁾

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, Karlstr. 29, D 8000 München 2

(30.IX.85)

The Toxic and Sedative Bufadienolides of *Kalanchoe daigremontiana* HAMET et PERR.

From the toxic Crassulaceae *Kalanchoe daigremontiana* five biosynthetically related bufadienolides have been isolated and structurally elucidated by X-ray and ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy. The compounds were identified as bersaldegenin 1,3,5-orthoacetate (2), bersaldegenin 1-acetate (4), bersaldegenin 3-acetate (3), 1 β ,3 β ,5,11 α ,14-pentahydroxy-12,19-dioxo-5 β ,14 β -bufa-20,22-dienolide 1,3,5-orthoacetate (= daigremontianin; 1), and 3 β -acetoxy-1 β ,5,14-trihydroxy-5 β ,14 β -bufa-20,22-dienolide (= daigredorigenin-3-acetate, 5). According to the pharmacological investigations, the two orthoacetates 1 and 2 comprise the positive inotropic, sedative, and toxic activity of the plant.

Einführung. – Einige Pflanzen aus der Familie der Crassulaceae, insbesondere der in Südafrika vorkommenden Gattungen *Cotyledon* (*Tylecodon*) und *Kalanchoe*, sind seit längerem als toxisch bekannt. Laut *Sapeika* [1] enthalten sie herzwirksame und neurotoxische Verbindungen, die beim Weidevieh die sogenannte Cotyledonosis (= 'Krimpsiekte') hervorrufen und in Südafrika nennenswerten wirtschaftlichen Schaden verursachen [2]. Die Toxizität der auf Madagaskar heimischen Pflanze *Kalanchoe daigremontiana* HAMET et PERR. (syn. *Bryophyllum daigremontianum* BERGER) wurde 1968 in einer Arbeit von *Friedrich* und *Krüger* [3] bestätigt, ohne dass ein Wirkprinzip isoliert und strukturell aufgeklärt werden konnte. Es wurde als ein oxidations-, säure- und basenempfindliches 'Terpen' klassifiziert, das nur in den Wurzeln nachgewiesen werden konnte. Daneben existieren auch Berichte über eine stark sedierende und teilweise toxische Wirkung von Extrakten aus oberirdischen Drogenteilen²⁾.

Lokalisierung und Isolierung der Wirkprinzipien. – Zur Prüfung auf vorhandene Wirkprinzipien wurden Mäusen *p. o.* und *i. p.* verschiedene Lösungsmittelfractionen (Petrolether, CH₂Cl₂, BuOH, H₂O) verabreicht und die Motilität im Lichtschrankenkäfig nach *Dews* [4] und das Gesamtverhalten der Tiere registriert. Danach zeigten vor allem die CH₂Cl₂-Auszüge und zwar sowohl aus Wurzeln als auch aus oberirdischen Drogenteilen etwa gleich starke Wirksamkeit bzw. Toxizität. Aus den Wurzeln konnte aber, verglichen mit den Blättern, eine ca. 50mal grössere Menge der CH₂Cl₂-Fraktion gewonnen werden.

Eine genaue Lokalisierung der aktiven Prinzipien gelang durch DC-Vergleich der *Kalanchoe-daigremontiana*-Extrakte mit dem Extrakt des pharmakologisch inaktiven *Kalanchoe-blossfeldiana*-Hybriden 'Norisfeuer', einer Gartenvarietät. Im wirkungslosen

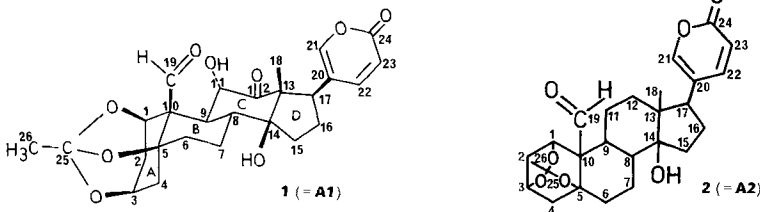
¹⁾ Aus der Dissertation von *Manfred Fischer*, München, 1985.

²⁾ Private Mitteilung der Fa. *Wander Ltd.*, Bern, Schweiz.

Extrakt fehlten drei mit *Godin*-Reagens anfärbbare Verbindungen (A–C). Sie wurden aus dem *Kalanchoe-daigremontiana*-Extrakt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit AcOEt/C₆H₅CH₃/(CH₃)₂CO 10:3:2 in angereicherter Form erhalten. Verbindung **A** wurde weiter durch präp. DC gereinigt und durch präp. HPLC in die zwei Komponenten **A1** und **A2** aufgetrennt. Die Verbindungen **B** und **C** wurden durch präp. HPLC in sehr reiner Form erhalten.

Eine auf Teneriffa (Kanarische Inseln) geerntete Drogencharge enthielt nur die Verbindungen **A1**, **A2** und **B** sowie eine weitere Verbindung **D**, die ebenfalls durch Säulenchromatographie und präp. HPLC rein isoliert werden konnte (s. *Exper. Teil*).

Struktur der isolierten Verbindungen. – Voruntersuchungen zur chemischen Natur der isolierten Substanzen mit Hilfe von UV-, IR- und 80-MHz-¹H-NMR-Spektroskopie deuteten auf das Vorliegen von zuckerfreien Bufadienolid-Verbindungen.



Substanz A1 (= 1). Die Substanz **A1** (MG. 486) konnte nach langen Versuchsreihen aus EtOH/Heptan 1:1,5 kristallin gewonnen werden, was eine Röntgenstrukturanalyse ermöglichte [5]. Danach stellt **A1** das bisher nicht beschriebene *1β,3β,5,11α,14-Penta-hydroxy-12,19-dioxo-5β,14β-bufa-20,22-dienolid-1,3,5-orthoacetat* (= *Daigremontianin*; **1**) dar (s. *Fig. 1*).

Der verwendete, pyramidenförmige Einkristall besass die folgenden Gitterkonstanten und Kristalldaten: Raumgruppe: monoklin $P2_1$; $a = 6,691 \text{ \AA}$, $b = 18,456 \text{ \AA}$, $c = 9,257 \text{ \AA}$, $\beta = 96,11^\circ$; $\rho = 1,421 \text{ gm}^{-3}$; $Z = 2$. Auf einem automatischen Einkristalldiffraktometer wurden mit MoK_α -Strahlung (Graphit-Monochromator) 2127 unabhängige Reflexe vermessen ($\theta_{\text{max}} = 24^\circ$), von denen $2085 \geq 2\sigma(I)$ waren und somit als beobachtet gewertet wurden. Die Strukturbestimmung mit 'Direkten Methoden' unter Verwendung des Programmsystems SHELXTL [6] war wegen einer auftretenden Überlagerung der tatsächlichen Struktur mit ihrem Spiegelbild in der Raumgruppe $P2_1$ nicht möglich, gelang aber nach Verdopplung des Datensatzes in der Raumgruppe $P1$. Nach Rücktransformation in $P2_1$ konvergierte die Struktur bei einem R -Faktor von 7,26%³⁾.

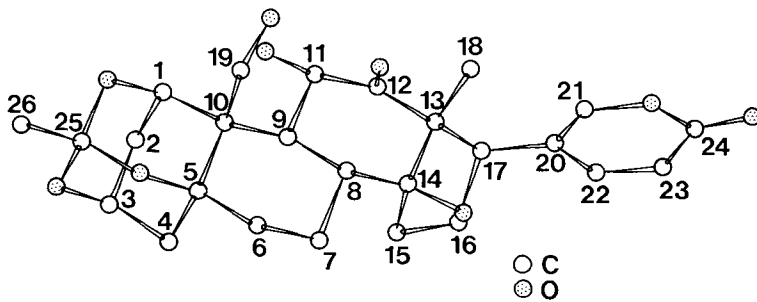


Fig. 1. Kristallstruktur von *Daigremontianin* (**1**)

³⁾ Die Atomkoordinaten sind im *Cambridge Crystallographic Data Centre* hinterlegt.

Durch 2D-COSY-NMR-Spektroskopie von **1** und Vergleich mit dem im C-Ring gleich substituierten Lucibufagin C (= 12-Oxo-2 β ,3 β -di-O-acetyl-5 β ,11 α -dihydroxybufalin) [7] gelang eine Zuordnung nahezu aller ^1H - und ^{13}C -NMR-Resonanzen (s. *Exper. Teil*).

Die Orthoestergruppierung verändert die entsprechenden ^1H - und ^{13}C -Signale in charakteristischer Weise. Das Aldehyd-Proton bei 10,4 ppm ist aufgrund einer weitreichenden Kopplung zum $\text{H}_\alpha\text{-C}(9)$ aufgespalten ($^4J = 2$ Hz). Die W-Anordnung der beiden Protonen ergibt sich durch eine bevorzugte Konformation des Aldehyds, die wiederum durch H-Brücken zwischen Aldehyd-Proton und den β -ständigen O-Atomen an C(1) bzw. C(5) bedingt sein muss. Die m bei 5,15 und 4,36 ppm sind H-C(1) bzw. H-C(3) zuzuordnen, wobei die Carbonylgruppe am C(19) das H-C(1) stärker entschirmt. H-C(3) zeigt aufgrund der komplexeren Kopplungen das breitere m . Die Signale der CH_3 -Gruppe des Orthoesters liegen bei 1,46 bzw. 25,6 ppm.

Daigremontianin (**1**) ist als Orthoacetat strukturell verwandt mit dem Bersaldegenin-1,3,5-orthoacetat (**2**) aus *Bersama abyssinica* FRESEN. [8], das keine Substituenten an C(11) und C(12) trägt, und mit dem Melianthusigenin aus *Melianthus comosus* VAHL [9], das sich von Bersaldegenin-orthoacetat nur durch eine CH_2OAc -Gruppierung unterscheidet.

Tab. ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten (CDCl_3) von Bersaldegenin-1,3,5-orthoacetat (**2**)

	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]		δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]
CH (1)	4,57	70,8	C (14)	–	84,5
CH ₂ (2)	1,65 (H_α), 2,45 (H_β)	27,3	CH ₂ (15)	1,65, 1,88	31,7
CH (3)	4,31	66,8	CH ₂ (16)	1,73 (H_α), 2,15 (H_β)	28,4
CH ₂ (4)	1,97 (H_β), 2,20 (H_α)	33,5	CH (17)	2,43	50,8
C (5)	–	74,5	CH ₃ (18)	0,63	16,3
CH ₂ (6)	1,63 (H_α), 2,31 (H_β)	32,6	CH (19)	10,17	206,6
CH ₂ (7)	1,38 (H_α), 2,10 (H_β)	22,2	C (20)	–	122,0
CH (8)	1,57	42,5	CH (21)	7,2	148,7
CH (9)	1,48	41,0	CH (22)	7,75	146,5
C (10)	–	52,7	CH (23)	6,23	115,4
CH ₂ (11)	1,35, 1,55	20,6	C (24)	–	162,2
CH ₂ (12)	1,24 (H_α), 1,49 (H_β)	40,1	C (25)	–	111,0
C (13)	–	48,5	CH ₃ (26)	1,39	25,7

Substanz A2 (= **2**). Das ^1H -NMR-Spektrum von **A2** ($M^+ 456$, $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_7$) zeigt wie bei Daigremontianin (**1**) ein Aldehyd-Proton, 2 quartäre CH_3 -Gruppen und die charakteristischen Signale eines Bufadienolid-Lactons (s. *Tabelle*). Da die Signale einer CH_3 -Gruppe bei nahezu gleichem Feld wie bei **1** liegen (1,39 und 25,7 ppm) und das MS eine Acetat-Abspaltung zeigt, muss auch hier eine 1,3,5-Orthoester-Gruppierung vorliegen. Die NMR-Signale für ein $\text{OH-C}(11)$ sowie ein $\text{C}(12)=\text{O}$ fehlen. Durch eine DEPT-Pulssequenz [10] konnten die Multiplizitäten aller beobachteten ^{13}C -NMR-Signale bestimmt werden (s. *Tabelle*). Ein 2D-C,H-COSY-NMR-Spektrum lieferte die Korrelation mit den verknüpften H-Atomen, ein 2D-H,H-COSY-NMR-Spektrum deren Kopplungen untereinander. Substanz **A2** erwies sich als identisch mit *Bersaldegenin-1,3,5-orthoacetat* (**2**), das bisher zweimal aus Vertretern der Melianthaceen-Familie [8] [9] isoliert worden war. Durch Vergleich mit Modellverbindungen, das Aufsuchen von weitreichenden Kopplungen von zueinander W-förmig angeordneten Protonen [11] und die Interpretation der durch die *Karplus*-Gleichung bestimmten Grösse vicinaler Kopplungskonstanten liessen sich die chemischen Verschiebungen von 6 der 8 geminalen *AB*-Systeme der Verbindung eindeutig den α - bzw. β -ständigen Protonen zuordnen (s. *Tabelle*).

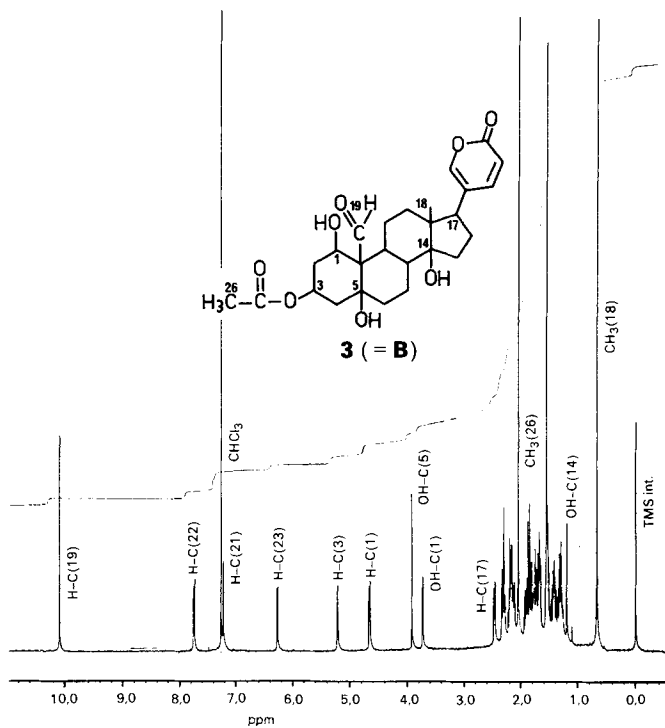
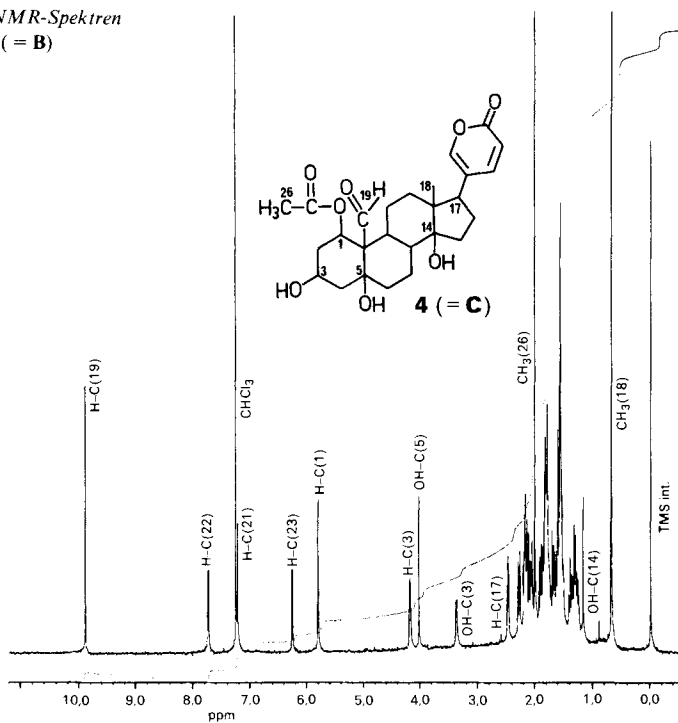


Fig. 2.
500-MHz- ^1H -NMR-Spektren
(CDCl_3) von **3** (**B**)
und **4** (**C**)



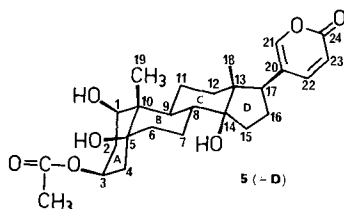
Substanzen B (= 3) und C (= 4). Die Substanzen **B** und **C** besitzen identische MS. Aus dem Molekülonenpik ($M^+ 474$) und einer quantitativen C,H-Analyse errechnete sich für beide Verbindungen die gleiche Summenformel $C_{26}H_{34}O_8$. Wegen der geringen Substanzmengen und der schlechten Löslichkeiten in $CDCl_3$ wurden Hochfeld- 1H -NMR-Spektren (500 MHz) von **B** und **C** aufgenommen (s. *Fig. 2*). Neben den charakteristischen Signalen des Bufadienolid-Lactonrings, der $CH_3(18)$ -Gruppe, eines Aldehyd-Protons und des $H_\alpha-C(17)$ [12] weisen beide Verbindungen eine tieffeldverschobene CH_3 -Gruppe auf (**B**: 2,05; **C**: 2,01 ppm), die in ihrer Lage kennzeichnend für eine Acetylgruppe ist [12]. Damit sollte es sich um Monoacetate des Bersaldehygens handeln. Die Bestätigung brachte eine gleichzeitig mit Substanz **2** und **B** durchgeführte Mikrohydrolyse auf der DC-Platte. Es wurden identische Spaltprodukte erhalten (s. *Exper. Teil*).

Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der 1H -NMR-Signale zwischen 3 und 6 ppm von **B** und **C** und durch einen D_2O -Austausch konnten die Strukturen abgeleitet werden. Der D_2O -Austausch zeigte zuerst die Lage der OH-Protonen und ihrer geminalen Kopplungspartner an: Im Spektrum von **B** sind das *s* bei 3,91 ppm (OH-C(5)) und das *d* bei 3,73 ppm ($J = 7$ Hz, OH-C(1)) verschwunden. Gleichzeitig hat sich die Breite des *m* von H-C(1) bei 4,65 ppm um den Kopplungsbetrag von 7 Hz verringert. Das Signal bei 5,21 ppm entspricht H-C(3). Die Zuordnung erfolgte durch Vergleich mit dem entsprechenden Signal des 3-*O*-Acetyl-hellebrigenins, das mit Ausnahme der 1-OH-Gruppe die gleichen Substituenten besitzt wie das Bersaldehygen und dessen H-C(3) in $CDCl_3$ bei 5,27 ppm liegt [12]. Substanz **B** ist demnach *Bersaldehygen-3-acetat* (**3**).

Im 1H -NMR-Spektrum von **C** in D_2O sind das *s* bei 4,03 ppm (OH-C(5)) sowie das *d* bei 3,37 ppm ($J = 6$ Hz, OH-C(3)) verschwunden. Gleichzeitig hat sich die Breite des *m* von H-C(3) bei 4,18 ppm um den Kopplungsbetrag von 6 Hz verringert. Das Signal bei 5,80 ppm entspricht H-C(1). Die höhere Tieffeldverschiebung im Vergleich zu H-C(3) von **3** ist eine Folge des anisotropen Effektes von C(19)=O. Es ergibt sich somit für Substanz **4** die Struktur eines *Bersaldehygen-1-acetates*.

Substanz **3** wurde bisher nur einmal von Kupchan [8] aus *Bersama abyssinica* FRESEN. isoliert. Substanz **4** wurde als Hydrolyseprodukt von **2** [8], nie aber als natürlich vorkommendes Bufadienolid selbst beschrieben.

Substanz D (= 5). Substanz **D** war nur aus der auf Teneriffa geernteten Drogencharge isolierbar. In ihrem 1H -NMR-Spektrum sind wieder die typischen Signale des Dien-lactons, der $CH_3(18)$ -Gruppe und von $H_\alpha-C(17)$ erkennbar. Anstelle eines Aldehyd-Signals erscheint ein weiteres CH_3 -Signal bei 1,22 ppm. Ein bei 2,05 ppm liegendes CH_3 -Signal kann aufgrund der chemischen Verschiebung wieder einer Acetylgruppe zugeordnet werden. Das dazu geminale Proton bei 5,26 ppm entspricht in seiner Lage fast genau dem 3α -Proton von Verbindung **3**. Damit ist auch für Substanz **D** eine Acetylierung in 3β -Stellung wahrscheinlich. Durch D_2O -Austausch verschwindet im 1H -NMR-Spektrum



ein *s* bei 1,60 ppm (OH–C(14)) sowie zwei Signale bei 2,92 und 3,12 ppm. Die breite, verschmelzende Form der beiden letzten Signale spricht für einen intramolekularen Protonen-Austausch von zwei räumlich benachbarten OH-Gruppen. Sehr wahrscheinlich ist eine 1,5-Dihydroxy-Substitution (s. **5**). Eine Berechnung der chemischen Verschiebung der CH₃(19)-Gruppe nach den *Zürcher*-Regeln [13] mit dieser Substituenten-Anordnung führte jedoch zu der relativ grossen Abweichung von 0,11 ppm (ber.: 1,11 ppm; gef.: 1,22 ppm). Wir versuchten daher, die Struktur durch Röntgenstrukturanalyse zu sichern. Der geeignete Einkristall wurde aus Aceton/MeOH 3:1 erhalten.

Der Einkristall von **5** hatte die folgenden Gitterkonstanten und Kristalldaten: Raumgruppe: orthorhombisch, $P2_12_12_1$; $a = 11,254 \text{ \AA}$, $b = 14,199 \text{ \AA}$, $c = 14,361 \text{ \AA}$; $\rho = 1,33 \text{ g cm}^{-3}$; $Z = 4$. Auf einem automatischen Einkristalldiffraktometer wurden mit CuK_α -Strahlung (Ni-Filter) 1632 unabhängige Reflexe vermessen ($\theta_{\text{max}} = 57^\circ$), von denen $1482 \geq 4 \sigma(I)$ waren und somit als beobachtet gewertet wurden. Die Strukturbestimmung mit 'Direkten Methoden' gelang mit dem Programmsystem SHELXTL [6]. Sie ergab einen *R*-Faktor von 7,9%³.

Daraus ergab sich für Substanz **D** die Struktur eines *3β-Acetoxy-1β,5,14-trihydroxy-5β,14β-bufa-20,22-dienolids* (= *Daigredorigenin-3-acetat*; **5**; Fig. 3). Sie ist, wie die ihr zugrunde liegende Desacetylverbindung *Daigredorigenin*, bisher noch nicht beschrieben worden. Bekannt ist jedoch eine analoge Verbindung aus der Cardenolid-Reihe, das *Evonogenin* [14], das sich von **5** nur durch den 5gliedrigen Lactonring unterscheidet.

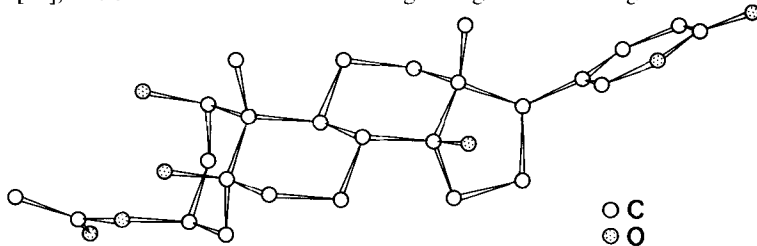


Fig. 3. Kristallstruktur von *Daigredorigenin-3-acetat* (**5**)

Die isolierten Bufadienolide lassen sich in folgende mögliche Biosynthese-Kette einordnen: **5** → Oxidation an C(19) → **3** (**4**) → Cyclisierung ($-\text{H}_2\text{O}$) → **2** → Oxidation an C(11) und C(12) → **1**.

Konfiguration und Pharmakologie. – Zur Ermittlung der absoluten Konfiguration wurden von den Substanzen **1**, **2** und **5** CD-Spektren in MeCN aufgenommen. Wir erhielten für **2** und **5** die gleichen Spektren wie sie für alle Bufadienolide mit 14β-OH-Substitution charakteristisch sind: einen negativen *Cotton*-Effekt um 300 nm mit Schulter bei 260 nm. Substanz **1** zeigt zusätzlich den positiven *Cotton*-Effekt von C(12)=O bei 280 nm, wie er bereits von *Djerassi et al.* [15] für *Sinogenin* publiziert wurde. Damit dürften alle untersuchten Bufadienolide die 'Normalkonfiguration' besitzen.

Die positiv inotrope Wirkung der beiden Orthoester **1** und **2**, getestet am isoliert perfundierten Meerschweinchen-Herzmuskel in einer Modifikation nach *Langendorff* [16], war stark ausgeprägt und im Wirkungsmechanismus mit bekannten Herzglycosiden vergleichbar. Substanz **2** wurde zusätzlich in einer Versuchsanordnung nach *Reiter* [17] getestet. Sie zeigte am Kaninchen-Papillarmuskel ab 10^{-6}M , an Meerschweinchen-Vorhöfen ab $3 \times 10^{-7}\text{M}$ positiv inotrope Wirkung.

Die Prüfung der beiden Orthoester auf sedierende Aktivität erfolgte in einem neu entwickelten Radarkäfig zur Motilitätsüberwachung [18]. Beide Substanzen bewirkten

auch in subtoxischen Konzentrationsbereichen von 0,1–0,5 mg/kg eine starke Motilitätshemmung. Bei höherer Dosierung erwies sich vor allem Bersaldegenin-1,3,5-orthoacetat (**2**) als äusserst toxisch. Es rief bereits in Konzentrationen um 1 mg/kg die typischen Symptome der 'Krimpsiekte' [19] hervor. Die beiden Orthoacetate **1** und **2** können somit als die toxischen bzw. sedierenden Wirkprinzipien von *Kalanchoe daigremontiana* HAMET et PERR. angesehen werden.

Prüfung auf Bufadienolide in anderen Vertretern der Crassulaceen-Familie. – Sechs weitere Drogen der Crassulaceen-Familie, die entweder als toxisch beschrieben oder mit *Kalanchoe daigremontiana* nahe verwandt sind, wurden chromatographisch auf das Vorhandensein ähnlicher Bufadienolid-Derivate untersucht: *Kalanchoe gracilis* HANCE, *Kalanchoe tomentosa* BAKER, *Kalanchoe tubiflora* HAMET, *Cotyledon orbiculata* L., *Cotyledon* (jetzt: *Tylecodon*) *paniculata* L. f. und *Cotyledon* (jetzt: *Tylecodon*) *cacalioides* L. f. *Kalanchoe tubiflora* enthielt die Substanzen **2** und **3**, während in allen anderen Pflanzenproben keine Bufadienolide nachweisbar waren.

Nach Abschluss unserer Arbeiten erschienen Mitteilungen über ein Bufadienolid (Cotyledosid) aus *Tylecodon wallichii* (HARV.) TOELKEN [20] und das Vorkommen von Hellebrigenin-Derivaten in *Kalanchoe lanceolata* (FORSSK.) PERS. [21].

Wir danken Herrn Prof. J. Sonnenbichler (München), Herrn Dr. W. Hull (Bruker AG, Karlsruhe), Herrn Dr. O. Seligmann (Institut für Pharmazeutische Biologie, München) und Herrn Prof. G. Snatzke (Bochum) für die Aufnahme verschiedener Spektren, Herrn Dr. Baumann (München) und Herrn Prof. G. Scholtysik (Firma Sandoz, Basel) für die Testung auf Herzwirksamkeit sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die grosszügige Unterstützung der Arbeit mit Sachmitteln. Unser Dank gilt ferner dem Botanischen Garten des Botanischen Institutes der Universität München und Herrn Dr. Bruce, Karoo Botanic Garden, Worcester, Rep. South Africa, für die Bereitstellung von Pflanzenmaterial.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Säulenchromatographie: Kiesegel (60 mesh, Merck); Säulen mit 2,8 cm Innen-Durchmesser, $l = 40$ cm; System A = EtOAc/C₆H₅CH/(CH₃)₂CO 10:3:2, 35–40 Tropfen/min. DC: Kiesegel-Fertigplatten 60 F 254 (Merck) im System A; Detektion der Bufadienolide mit SbCl₅- oder Godin-Reagens. HPLC: Perkin-Elmer Serie 3B, U6K (Waters Assoc.); μ -Bondapak C 18, 300 × 3,9 mm ID (anal.), 300 × 7,8 mm (präp.); 25–30% MeCN/H₂O; Detektion bei 220 (298) nm mit Spektralphotometer Schoeffel SF 770. Schmelzpunkte (Schmp.) auf der Kofler-Mikroheizbank. $[\alpha]_D^{20}$: Polarimeter LEP A2 (Zeiss) in MeOH bzw. CHCl₃ (Uvasol[®], Merck). UV-Spektren (λ_{\max} in nm (ϵ)): in MeOH *p. a.*; UV-Spektrometer DB-GT (Fa. Beckmann). CD-Spektren (λ in nm (ΔE)): Dichrograph Mark III von ISA-Jobin-Yvon mit PDP-8/e als EDV-Teil. IR-Spektren (cm⁻¹): in KBr; AccuLab-1-Spektrometer (Fa. Beckmann). ¹H-NMR-Spektren (δ in ppm, J in Hz): Bruker Wp-80 (80 MHz), und Bruker Am-500 (500 MHz). ¹³C-NMR-Spektren: Bruker WP-200 (50,3 MHz). 2D-COSY-Spektren (H,H) für **1** auf Bruker AM-500, 2D-COSY-Spektren (H,H und C,H) und DEPT-Spektroskopie für **2** auf Bruker AM-400. Elementaranalyse: CHN-Analysator 185 (Hewlett Packard). Massenspektren: Massenspektrometer MS 30 (Fa. AEI). Röntgenstrukturanalyse von **1**. Enraf-Nonius-CAD-4-Diffraktometer, MoK_α-Strahlung, Graphit-Monochromator. Röntgenstrukturanalyse von **5**: Nicolet-R-3M Diffraktometer, CuK_α-Strahlung, Ni-Filter, Rechenanlage Nova 3 (Data General).

Pharmakologische Testung. Sedativtests: a) im Lichtschrankenkäfig der Fa. Laue, Elmshorn; b) im Radarkäfig RBM III (Fa. MSE, München, und Intron Electronic, Geretsried). Testung auf positive Inotropie: a) modifizierte Langendorff-Methode [16]; b) Methode nach Reiter [17].

Mikrohydrolyse auf DC-Platten [22]. Die Substanzen **2** und **3** wurden strichförmig auf DC-Platten aufgetragen, in eine 1-cm hoch mit HCl gefüllte Glaskammer gegeben und 2 1/2 h bei 55° im Trockenschrank der HCl-Atmosphäre ausgesetzt. Nach Entfernen von HCl durch 1 h Föhnen unter dem Abzug wurde die Platte wie üblich im System A entwickelt.

Herkunft der Drogen. Kalanchoe daigremontiana: a) Eigenkultivierung; b) Sammlung auf Teneriffa (Südküste). *Kalanchoe-blossfeldiana*-Hybrid 'Norisfeuer': Gärtnerei Rehm, München. *Kalanchoe tubiflora*: Eigenkultivierung. *Kalanchoe tomentosa*: Institut für Botanik, München. *Kalanchoe gracilis*: Sammlung auf La Palma (Kanarische Inseln) von Prof. Dr. H. Wagner. *Cotyledon orbiculata*, *Tylecodon paniculata*, *Tylecodon calalioides*: Karoo Botanischer Garten, Südafrika.

Isolierung der Bufadienolide. Gefriergetrocknete oberirdische Pflanzenteile (ca. 750 g) wurden im Soxhlet-Apparat 3 Tage mit MeOH extrahiert (2,5 l/100 g Droge). Nach Einengen im Rotationsverdampfer bis zur sirupösen Konsistenz wurde der Extrakt (ca. 15 g) in H₂O/MeOH 9:1 aufgenommen und 5mal in kleinen Portionen mit Petrolether ausgeschüttelt. Die zurückbleibende H₂O/MeOH-Phase wurde in gleicher Weise mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt, die vereinigte CH₂Cl₂-Phase über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Rückstand: ca. 1,80 g. Die CH₂Cl₂-Fraktionen wurden in möglichst wenig Laufmittel A gelöst und über Kieselsäulen aufgetrennt. Das Eluat wurde in Fraktionen zu ca. 12 ml (all 30 min) aufgefangen (DC-Kontrolle) und i. V. eingeeengt. Wir erhielten dabei aus 1,670 g Rohfraktion 295 mg A (= 1/2), 38 mg B (= 3), 14 mg C (= 4) und 19 mg D (= 5) in angereicherter Form. Substanz C war nur in selbstkultivierter Droge, Substanz D nur in der Teneriffa-Droge vorhanden.

Die A enthaltenden Säulenfraktionen (295 mg) wurden in CH₂Cl₂ (1 ml/100 mg) aufgenommen und mittels präp. DC (0,5 ml (= 5 mg)/Platte) im System A weiter gereinigt (UV₂₅₄-Detektion). Das A enthaltende Kieselgel wurde 3 × 20 min lang mit CH₂Cl₂/Aceton 2:1 gerührt, das Eluat durch eine Glasfritte G₄ und dann durch ein Membranfilter (Sartorius Typ SM, Porengrösse 0,45 μm) filtriert und eingeeengt: ca. 200 mg. Durch präp. HPLC mit 30% MeCN/H₂O liess sich A in die beiden Komponenten A1 (= 1; t_R ca. 13 min) und A2 (= 2; t_R ca. 24 min) auftrennen: 20,7 mg 1 und 164 mg 2.

Die B enthaltenden Säulenfraktionen (38 mg) wurden in MeCN gelöst. Durch präp. HPLC mit 25,5 bzw. 30% MeCN/H₂O wurden daraus 10,5 mg 3 rein gewonnen (t_R ca. 25 bzw. 10 min).

Die C enthaltenden Säulenfraktionen (14 mg) wurden in MeCN gelöst. Durch präp. HPLC mit 25% MeCN/H₂O wurden daraus 4,7 mg 4 rein gewonnen (t_R 25 min).

Die D enthaltenden Säulenfraktionen (19 mg) wurden in MeCN gelöst. Durch präp. HPLC mit 30% MeCN/H₂O wurden daraus 12,5 mg 5 rein gewonnen (t_R 11,8 min).

Substanz A1 (= 1). DC: R_f 0,59 (System A). Schmp. 270–280°. [α]_D²⁰ = +10° (c = 0,237, MeOH). UV: 298 (5500). CD (MeCN, 0,15 mmol/l, d = 0,5 cm): 319 (–0,89), 312 (–0,87), 283 (+0,48), 254 (+0,1), 230 (+0,21), 212 (–0,9). IR: 3450 (OH), 1710 (C=O), 1630 (C–O). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 3,15 (m, H–C(1)); 2,50, 1,95 (2m, CH₂(2)); 4,36 (m, H–C(3)); 2,50, 1,95 (2m, CH₂(4)); 2,05?, 1,70? (2m, CH₂(6)); 2,2?, 1,43 (2m, CH₂(7)); 2,22 (m, H–C(8)); 1,55 (m, H–C(9)); 4,98 (dd, J = 11, 4, H–C(11)); 3,73 (d, J = 4, OH–C(11)); 1,87 (s, OH–C(14)); 1,44, 1,16 (2m, CH₂(15)); 2,05, 1,73 (2m, CH₂(16)); 4,07 (dd, J = 10, 6, H–C(17)); 0,91 (s, CH₃(18)); 10,40 (d, J = 2, H–C(19)); 7,38 (dd, J = 2,5, 1, H–C(21)); 7,66 (dd, J = 10, 2,5, H–C(22)); 6,28 (dd, J = 10, 1, H–C(23)); 1,46 (s, CH₂(26)). ¹³C-NMR: 72,1 (C(1), a⁴); 27,6 (C(2), b⁴); 67,2 (C(3)); 33,4 (C(4), c⁴); 74,7 (C(5)); 33,3 (C(6), c⁴); 22,1 (C(7)); 40,4 (C(8), d⁴); 45,1 (C(9)); 52,4 (C(10)); 73,2 (C(11), a⁴); 211,8 (C(12)); 61,9 (C(13)); 85,0 (C(14)); 32,1 (C(15), c⁴); 27,7 (C(16), b⁴); 39,8 (C(17), d⁴); 16,9 (C(18)); 206,8 (C(19)); 120,1 (C(20)); 150,3 (C(21)); 146,1 (C(22)); 115,9 (C(23)); 161,8 (C(24)); 110,6 (C(25)); 25,6 (C(26)). MS: 486 (22, M⁺, C₂₆H₃₀O₉), 468 (5), 458 (12), 450 (1), 440 (5), 422 (2), 408 (3), 398 (43), 380 (22), 362 (15), 261 (16), 243 (20), 220 (15), 201 (31), 193 (37), 175 (27), 147 (18), 131 (23), 123 (23), 91 (35), 79 (34), 55 (44), 43 (100).

Substanz A2 (= 2). DC: R_f 0,60 (System A). Schmp. 290–300°. [α]_D²⁴ = –28,6° (c = 0,475, CHCl₃). UV: 298 (5620). CD (MeCN, 0,25 mmol/l, d = 0,5 cm): 306 (–1,22), 300 (–1,23), 257 (–0,53). IR: 3480 (OH), 1710 (C=O), 1300 (C–O). ¹H- und ¹³C-NMR: Tabelle. MS: 456 (47, M⁺, C₂₆H₃₂O₇), 438 (1), 428 (2), 420 (< 1), 410 (2), 396 (2), 378 (7), 368 (27), 360 (5), 350 (25), 332 (13), 325 (8), 307 (50), 241 (12), 195 (13), 185 (13), 144 (30), 123 (27), 91 (37), 79 (23), 55 (28), 43 (100).

Substanz B (= 3). DC: R_f 0,35 (System A). Schmp. 255–260°. [α]_D²² = –6° (c = 1,19, CHCl₃/MeOH 5:1, vgl. [7]). UV: 298 (5200). IR: 3400 (OH), 1710 (C=O), 1370 (C–O). ¹H-NMR: 0,67 (s, CH₃(18)); 1,20 (s, OH–C(14)); 2,05 (s, CH₂(26)); 2,46 (dd, J = 10, 6, H–C(17)); 3,73 (d, J = 7, OH–C(11)); 3,91 (s, OH–C(5)); 4,65 (m, H–C(1)); 5,21 (m, H–C(3)); 6,26 (dd, J = 10, 1, H–C(23)); 7,22 (dd, J = 2,5, 1, H–C(21)); 7,75 (dd, J = 10, J = 2,5, H–C(22)); 10,1 (s, H–C(19)); übrige Gerüstprotonen bei 1,2–2,3. MS: 474 (< 1, M⁺, C₂₆H₃₄O₈), 456 (< 1), 438 (< 1), 414 (< 1), 396 (1), 378 (11), 368 (5), 360 (13), 353 (17), 335 (20), 307 (10), 301 (24), 123 (40), 91 (45), 43 (100).

Substanz C (= 4). DC: R_f 0,15 (System A). Schmp. 235–245°. [α]_D²² = +0° (c = 1,14, CHCl₃/MeOH 5:1; vgl. [7]). UV: 298 (5150). IR: 3490 (OH), 1710 (C=O), 1250 (C–O). ¹H-NMR: 0,67 (s, CH₃(18)); 1,17 (s, OH–C(14)); 2,01 (s, CH₂(26)); 2,48 (dd, J = 10, 6, H–C(17)); 3,37 (d, J = 6, OH–C(3)); 4,03 (s, OH–C(5)); 4,18 (m, H–C(3)); 5,80 (m, H–C(1)); 6,26 (dd, J = 10, 1, H–C(23)); 7,23 (dd, J = 2,5, 1, H–C(21)); 7,74 (dd, J = 10, 2,5, H–C(22));

⁴) Evtl. austauschbare Zuordnungen sind mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet.

9,89 (s, H–C(19)); übrige Gerüstprotonen bei 1,2–2,3. MS: 474 (< 1, M^+ , $C_{26}H_{34}O_8$), 456 (< 1), 438 (< 1), 414 (4), 396 (16), 378 (16), 368 (13), 360 (7), 353 (16), 335 (17), 307 (27), 301 (7), 123 (45), 91 (45), 43 (100).

Substanz **D** (= 5). DC: R_f 0,20 (System A). Schmp. 280–290°. $[\alpha]_D^{20} = -31,6^\circ$ ($c = 0,187$, MeOH). UV: 298 (5470). CD: 296 (–1,0), 293 (–1,0), 289 (–1,0), 264 (–0,81), 259 (–0,76), 254 (–0,72). IR: 3530 (OH), 1740, 1710 (C=O), 1370 (C–O). $^1\text{H-NMR}$: 0,71 (s, $\text{CH}_3(18)$); 1,22 (s, $\text{CH}_3(19)$); 1,60 (s, OH–C(14)); 2,05 (s, $\text{CH}_3(26)$); 2,46 (dd, $J = 10, 6$, H–C(17)); 2,92–3,12 (br., verschmelzende Signale, OH–C(1), OH–C(5)); 3,93 (m, H–C(1)); 5,26 (m, H–C(3)); 6,26 (dd, $J = 10, 1$, H–C(23)); 7,22 (dd, $J = 2,5, 1$, H–C(21)); 7,79 (dd, $J = 10, 2,5$, H–C(22)); übrige Gerüstprotonen bei 1,2–2,4. MS: 460 (0, M^+ , $C_{26}H_{36}O_7$), 442 (3), 424 (5), 416 (7), 406 (1), 400 (5), 382 (41), 364 (60), 339 (56), 321 (65), 207 (33), 158 (54), 157 (51), 131 (56), 123 (70), 105 (100), 91 (78), 69 (78), 55 (90).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] N. Sapeika, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1936**, *54*, 307.
- [2] T. W. Naude, *J. S. Afr. Biol. Soc.* **1977**, *18*, 7.
- [3] H. Friedrich, E. Krüger, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **1968**, *108*, 1273.
- [4] P. B. Dews, *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* **1953**, *8*, 46.
- [5] H. Wagner, M. Fischer, H. Lotter, *Planta Med.* **1985**, *2*, 169.
- [6] G. M. Sheldrick, SHELXTL (Release 2.5), A Program for Crystal Structure Determination, Cambridge–Göttingen, 1980.
- [7] J. Meinwald, D. Wiemer, T. Eisner, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3055.
- [8] S. M. Kupchan, I. Ognyanov, *Tetrahedron Lett.* **1969**, *21*, 1709.
- [9] K. H. Overton, 'Terpenoids and Steroids', Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, 1971, Vol. 1.
- [10] H.-O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun, ' $^{13}\text{C-NMR-Spektroskopie}$ ', Georg Thieme-Verlag, Stuttgart–New York, 1984.
- [11] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, 'Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie', 2. Aufl., Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1984.
- [12] L. Gsell, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1969**, *52*, 551.
- [13] R. F. Zürcher, *Helv. Chim. Acta* **1969**, *44*, 1380; *ibid.* **1963**, *46*, 2054.
- [14] S. G. Kislichenko, I. F. Makarevich, I. P. Kovalev, D. G. Kolesnikov, *Khim. Prir. Soedin.* **1969**, *5*, 386 (*Chem. Abstr.* **1970**, *72*, 79 305w).
- [15] C. Djerassi, O. Halpern, V. Halpern, O. Schindler, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 250.
- [16] O. Langendorff, *Pflügers Arch.* **1895**, *61*, 291.
- [17] M. Reiter, *Arzneim.-Forsch.* **1967**, *17*, 1249.
- [18] M. Fischer, Dissertation München, 1985.
- [19] J. Watt, M. Breyer-Brandwijk, 'Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa', 2nd edn., E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh–London, 1962.
- [20] P. S. Steyn, F. R. van Heerden, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 965.
- [21] L. A. P. Anderson, P. S. Steyn, F. R. van Heerden, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 1573.
- [22] T. Kartnig, O. Wegschaidler, *J. Chromatogr.* **1971**, *61*, 375.