

Über das Vorkommen von Bufotenin im gelben Knollenblätterpilz*)

Von Theodor Wieland und Werner Motzel
(Unter Mitarbeit von Hans Merz)

(Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. Main)

(Eingelaufen am 19. März 1953)

(Mit 2 Figuren im Text)

Bei der papierchromatographischen Analyse der Inhaltsstoffe von Knollenblätterpilzen wurde u. a. eine Substanz beobachtet, die mit Zimtaldehyd-HCl eine rostrote Färbung verursacht (Indolreaktion) und ammoniakal. Silbersalzlösung in der Kälte reduziert¹). Die Verbindung konnte als Inhaltsstoff des gelben Knollenblätterpilzes (*Amanita mappa*) erkannt werden. Wir haben sie als Mappin bezeichnet und aus einem streifenförmig aufgetragenen Papierchromatogramm s. Z. mit Wasser eluiert. Da dieses Eluat nach der Hydrolyse im Papierchromatogramm die Flecken einiger Aminosäuren erkennen ließ, wurde der Schluß gezogen, daß es sich beim Mappin um ein Peptid handle. Dies hat sich nunmehr als Irrtum herausgestellt, dem man offensichtlich leicht zum Opfer fallen kann, wenn man ausschließlich die papierchromat. Arbeitstechnik zur Erkennung und Charakterisierung von Substanzen verwendet, von denen nur wenig Material zur Verfügung steht. Dem von V. Wynn²) und später von C. S. Hanes und Mitarb.³) aufgefundenen Gehalt des Filterpapiers an Ninhydrin-negativen Peptiden wurde zwar durch

*) Zugleich 9. Mitteilung „Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes“. 8. Mitteilung s. Fußnote 1.

¹) Th. Wieland, G. Schmidt u. L. Wirth, Liebigs Ann. Chem. **577**, 215 (1952).

²) Nature [London] **164**, 445 (1949).

³) C. S. Hanes, F. J. R. Hird u. F. A. Isherwood, Biochem. J. **51**, 25 (1952).

Elution eines Kontrollstreifens Rechnung getragen, doch ließ es sich nicht erkennen, daß anscheinend bei der Elution unseres Mappins ein an gleicher Stelle im Chromatogramm befindliches Peptid ins Waschwasser gelangte, dessen Hydrolysenprodukte die erwähnte, falsche Tatsache vorspiegelten.

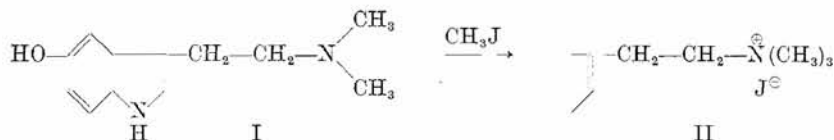
Als infolge eines günstigen Pilzvorkommens im Herbst 1952 auch größere Mengen von *Amanita mappa* eingebracht werden konnten, haben wir die Isolierung des Mappins im präparativen Maßstab durchgeführt. Die Verbindung wurde mit Methanol aus den frischen Pilzen extrahiert und nach einigen Fällungsoperationen aus Essigester mit 2*n*-Essigsäure ausgeschüttelt. Die nach diesem Verhalten offenkundig basische Natur wurde zur Gewißheit, als es gelang, aus der wäßrigen Lösung die Verbindung als rotes kristallisiertes Pikrat (Schmp. 176°) auszuschcheiden. Dieses ging beim Verreiben mit Benzol und beim Umkristallisieren aus Methanol in ein gelbes Pikrat vom Schmp. 180° über. Diese Verhältnisse erinnerten sehr stark an die vor längerer Zeit bei denselben Salzen des Krötensekretstoffes Bufotenin (5-Oxy-N-dimethyltryptamin, I) beobachteten⁴⁾. Wie dort, so ließ sich auch hier das gelbe Pikrat durch Umkristallisieren aus bicarbonathaltigem Wasser in ein bei Zimmertemperatur stabileres rotes verwandeln, das sich bei der Schmelzpunktnahme ab 140° in die oberhalb dieser Temp. stabile gelbe Form umwandelte, welche auch beim Umkristallisieren aus Methanol erhalten wird. Aus dieser, unterhalb des Umwandlungspunktes metastabilen Form verwandelt es sich im Verlauf einiger Wochen in die stabile rote. Die beiden Formen lieferten bei der Analyse die auf ein Monopikrat der Krötenbase stimmenden Werte, das ursprünglich bei Pikrinsäure-Überschuß gefällte rote die ihres Dipikrates.

Wir haben durch Vergleich der Extinktionen beider Pikrate mit der einer Na-pikratlösung definierten Gehaltes in Wasser bei 360 m μ das Molgew. des Kations unter den obigen Voraussetzungen bestimmt. Dabei ergaben sich Werte von 195 bzw. 210.

Die Zerlegung des gelben Monopikrats, das wir zur Reinigung einige Male aus Methanol umkristallisierten, geschah durch Filtrieren der wäßrigen acetoneischen Lösung durch den Cl[⊖] beladenen Kunstarztaustauscher Permutit ES, aus der erhaltenen Lösung des Hydrochlorids ließ sich durch Anwendung einer „basischen“ Al₂O₃-Säule (nach Brockmann) das Cl[⊖] gegen OH[⊖] austauschen, so daß nach dem Eindampfen des Filtrats die Base als wachsartige Masse erhalten wurde. Wir haben die schwierige Kristallisation der freien Base nicht versucht, sondern zu ihrer näheren Charakterisierung noch das krist. Oxalat und mit Methyljodid in Methanol das Jodmethyleat dargestellt.

⁴⁾ H. Wieland, W. Konz u. H. Mittasch, Liebigs Ann. Chem. **513**, 1 (1934).
H. Wieland u. Th. Wieland, ebenda, **528**, 239 (1937).

Letzteres wies den für Bufotenidinjodid⁴⁾ (II) beschriebenen Schmelzpunkt und dessen Analysenwerte auf.



Die letzten Zweifel an der Identität des Mappins mit Bufotenin wurden durch den direkten Vergleich mit einer Probe authentischen gelben Bufoteninpikrats aus München beseitigt. Sowohl dieses gelbe

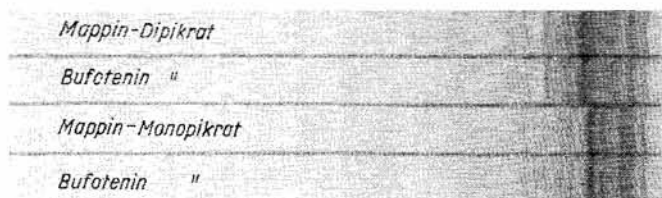


Fig. 1

Röntgendiagramme von Pikraten des Bufotenins und Mappins

Salz als auch eine aus ihm durch Umkrist. aus Methanol mit Pikrinsäure-Überschuß bereitete rote Dipikratprobe zeigten im Röntgendiagramm dieselben Interferenzlinien wie die entsprechenden Salze des Mappins (Fig. 1).

Außerdem zeigte die Krötenbase im Papierchromatogramm, auch in Mischung mit Mappin, denselben R_F -Wert (0,55^{*)}, so daß die Identität von Mappin mit Bufotenin gesichert sein dürfte. Die loc. cit. angegebene FeCl_3 -Reaktion, bei der infolge Oxydation allmählich eine tiefe Blaufärbung auftritt und die auch vom Mappin gegeben wird, läßt sich zum Nachweis der Base im Papierchromatogramm heranziehen, wo sie besonders schnell beim Erwärmen auftritt. In Fig. 2 ist das UV-Spektrum der Base dargestellt (I), dessen langwelliges Maximum im Vergleich zu dem des mit eingezeichneten 5-Methoxyindols (II) deutlich die phenolische Natur des Indolkörpers verrät.

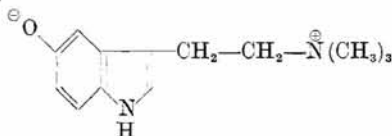
Außer den beschriebenen krist. Derivaten des Bufotenins haben wir aus den Basen von beiderlei Herkunft mit 2,4-Dinitrofluorbenzol eine weitere krist. Verbindung erhalten. Diese gibt mit FeCl_3 keine Farbreaktion mehr, hat die Fähigkeit zur Reduktion von Ag^+ ver-

^{*)} In der entmischten oberen Phase von 20 Vol. Methyläthylketon, 2 Vol. Aceton und 5. Vol. Wasser.

loren, gibt aber noch Fichtenspan (Zeitungspapier⁵)-Reaktion und Gelbfärbung mit Zimtaldehyd-Salzsäure. Aus Gründen ihrer, wenn auch schlechten Löslichkeit in Mineralsäuren und der Fähigkeit zur Bildung eines Pikrats als Base geben wir ihr, auch auf Grund der Elementaranalyse, die Formel des O-Dinitrophenylbufotenins.

Da sich Bufotenin papierchromatographisch sehr empfindlich nachweisen läßt, haben wir auch in anderen verwandten Pilzen nach ihm Umschau gehalten. Zur Untersuchung kam noch ein weißer, nicht ganz sicher definierter Knollenblätterpilz, ferner der Pantherpilz (*Amanita pantherina*) und der Fliegenpilz (*A. muscaria*). In den beiden ersten Pilzarten wurde die Base mit Sicherheit, im Fliegenpilz in sehr kleiner Menge, aber eindeutig nachgewiesen. In dem als sehr giftig verschrienen Pantherpilz fanden sich im Papierchromatogramm keinerlei Anhaltspunkte für das Auftreten der hochwirksamen Giftstoffe, wie sie im grünen Knollenblätterpilz (*A. phalloides*) vorkommen.

Weiterhin sollen hier noch kurz einige papier-elektrophoretische Beobachtungen am Bufotenin und seinem quartären Methylprodukt geschildert werden. Diese neben der Papierchromatographie zur Analyse von Stoffgemischen geeignete Methode zeigt, daß die aus beiden Ausgangsmaterialien isolierten Stoffe und ihre Jodmethylate zwischen p_H 2 und 9 gleiche Strecken zur Kathode zurücklegen. Verwendet man alkalischere Puffer, so bleibt die tertiäre Base in ihrer Wanderungsstrecke etwas hinter der quartären zurück, ein Abstand, der sich bei stärkerem Alkali noch vergrößert, bis bei p_H 13 die am N entladene tertiäre Base infolge ihrer phenolischen Natur nunmehr zur Anode wandert, während Bufotenidin, dessen kationischer Stickstoff erhalten bleibt, als Phenolbetain keine Wanderung mehr zeigt.



Heute, wo die Desmethylverbindung unserer Base als hormonartig blutdruckwirksame Substanz [Serotonin⁶), Enteramin⁷),

⁵) Th. Wieland, L. Wirth u. E. Fischer, Liebigs Ann. Chem. **564**, 152 (1949).

⁶) M. W. Rapport, A. A. Green u. J. H. Page, Science [Washington] **103**, 329 (1948).

⁷) V. Ersbamper u. B. Ansero, Nature [London] **169**, 800 (1952), vgl. Arzneimittel-Forschung **2**, 253 (1952).

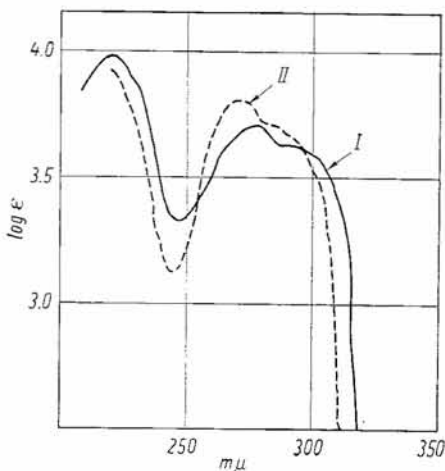


Fig. 2

I Bufotenin, II 5-Methoxyindol

Thrombocytin⁸⁾ = 5-Oxytryptamin] aus Säugetierorganen isoliert und auch als Inhaltsstoff der Parotisdrüse von *Bufo marinus*⁹⁾ aufgefunden wurde, ist das Interesse an der Biogenese solcher 5-Oxy-indol-Derivate neu erwacht. Dabei gewinnt die Ansicht B. Witkops¹⁰⁾ an Wahrscheinlichkeit, daß als Alternativweg der biolog. Oxydation des Tryptophans eine solche in 5-Stellung vor sich gehe.

Synthetisch dargestelltes 5-Oxytryptophan wird von Leberextrakten, die Tryptophan in Kynurenin verwandeln, nicht angegriffen¹¹⁾, hingegen von einem Protein aus Hunde- oder Meer-schweinchenniere im Gegensatz zu Tryptophan decarboxyliert¹²⁾. Zumal die Oxyamino-säure im Sekret von *Bufo marinus* enthalten zu sein scheint, mag sie die Vorstufe des Amins und sicherlich auch von dessen N-Methylderivaten sein. Für ein Vorkommen von 5-Oxytryptophan in *A. mappa* haben wir bisher keine sicheren Anhaltspunkte gewinnen können, wiewohl der Pilzextrakt im Papierchromatogramm mehrere Zimtaldehyd-positive, Ag⁺-reduzierende Flecken gibt. Die Fähigkeit des Pilzes zur enzymatischen Decarboxylierung dieses Substrats soll demnächst geprüft werden.

Da dieselbe reduzierende Wirkung auf Silberionen auch von den wirksamsten Giften des grünen Knollenblätterpilzes (α - und β -Amanitin) gegeben wird, die sich gleichermaßen als Indolkörper erwiesen haben, ist eine biogenetische Verwandtschaft beider Pilzinhaltsstoffe wahrscheinlich. Wie schon von H. Wieland und R. Hallermeyer¹³⁾ vermutet, kann es sich bei dem reduzierenden Baustein dieses Peptids um ein im Benzolring oxydiertes Tryptophan handeln, in dem wir auf Grund des vorliegenden Befundes die 5-Stellung für sehr wahrscheinlich halten. Nach unseren Ergebnissen bei der Entschwefelung mit Raney-Nickel¹⁾ möchten wir zusätzlich annehmen, daß es außer einer 2-fachen Peptidverknüpfung eine weitere zum Cysteinschwefel in α -Stellung des Indolrings besitzt.

Vielleicht erhält die angelsächsische Bezeichnung der Giftpilze als toad-stools (toad = Kröte) im Vorliegen ein und desselben seltenen Bauelements in den Inhaltsstoffen beider Kreaturen ihre naturwissenschaftliche Bewandnis.

⁸⁾ G. Reid u. M. Rand, *Nature* [London] **169**, 801 (1952).

⁹⁾ S. Udenfriend, C. T. Clark u. E. Titus, *Experientia* [Basel] **8**, 379 (1952).

¹⁰⁾ A. Ek, H. Kissman, J. B. Patrick u. B. Witkop, *Experientia* [Basel] **8**, 36 (1952).

¹¹⁾ A. Ek u. B. Witkop, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 500 (1953).

¹²⁾ S. Udenfriend, C. T. Clark u. E. Titus, ebenda, **75**, 501 (1953).

¹³⁾ Liebigs Ann. Chem. **548**, 1 (1941).

Beschreibung der Versuche

Isolierung von Bufotenin (Mappin) aus *Amanita mappa*

100 kg im Stadtwald von Frankfurt gesammelter, eindeutig identifizierter Pilze wurden am selben Tag in Methanol eingelegt. Nach 14-tägigem Stehen wurde der Extrakt abfiltriert und der Rückstand ausgepresst. Die methanolische Lösung wurde i. V. vollständig eingedampft, wobei ein dunkelbrauner, ölig-er Rückstand von 2 l hinterblieb. Dieser wurde mit 4 l Aceton versetzt, wobei eine braune Masse ausfiel, die in wenig Methanol aufgelöst und nochmals mit der zweibis dreifachen Menge Aceton ausgefällt wurde. Nach mehrmaliger Wiederholung dieser Umfällung resultierte eine braune Lösung, die auf 1 l i. V. eingedampft und einige Tage im Eisschrank aufbewahrt wurde. Dabei kristallisierten 500 mg Mannit aus. Das Filtrat wurde mit 2 l Äther versetzt, vom resultierenden dunkelbraunen Niederschlag wurde abgessogen und dieser noch zweimal nach Auflösen in wenig Methanol mit Äther umgefällt. Auf diese Weise reduzierte sich das Trockengewicht des in Methanol-Äther Löslichen auf etwa 25%. Die Lösung wurde nun abgedampft, der Rückstand in wenig Essigester aufgenommen und mehrmals mit kleinen Portionen 2*n*-Essigsäure ausgeschüttelt. Hierbei ging, wie die Papierchromatographie zeigte, der gesuchte Stoff vollkommen in die essigsäure Phase. Diese wurde nach dem Neutralisieren mit Ammoncarbonat zur Trockne verdampft; der Rückstand wurde mit Methanol extrahiert und diese Lösung eingedampft. Dabei hinterblieben 56 g eines zähen dunkelbraunen Sirups. Dieser wurde nun in 0,5 l Wasser gelöst und mit kaltgesättigter wäßriger Pikrinsäurelösung versetzt. Nach einigen Stunden kristallisierte ein dunkelrotes Pikrat (etwa 15 g) aus, das mehrmals aus Methanol umkristallisiert wurde, aus dem es in gelben Nadeln erhalten wurde. Schmp. 179—180°.

C 50,2 H 4,65 N 16,48

Rotes Dipikrat. Das oben beschriebene gelbe Salz wurde aus Methanol unter Zusatz eines Überschusses an Pikrinsäure umkristallisiert. Dabei erschienen dunkelrote Kristalle vom Schmp. 176—177°.

C 44,01 H 3,56 N 16,6

Beim Umkristallisieren aus Methanol schieden sich die gelben Nadeln der oben beschriebenen Verbindung ab. Diese färbten sich beim längeren Aufbewahren spontan nach Dunkelrot um.

Rotes Monopikrat. Das gelbe Monopikrat wurde aus der eben nötigen Menge wäßr. *n*/5-Na-Bicarbonat-Lösung umkristallisiert. Dabei schied sich ein rotes Kristallinat aus, das sich bei der Schmelzpunktnahme ab 120° langsam, dann immer schneller in die gelbe Modifikation umwandelte, die bei 179—180° schmolz.

Berechnete Werte für Bufotenin-Pikrate:

Monopikrat	C 49,88	H 4,42	N 16,16
Dipikrat	» 43,51	» 3,33	» 16,93

Spektrophotometrische Bestimmung des Molekulargewichtes der Base aus der Extinktion der Pikrate

Die Lösung von 1 mg Pikrinsäure in 1 l H₂O (unter Zusatz von wenig NaOH-Lösung) zeigte bei 360 *mμ* eine Extinktion von 1,30. 1 mg des obigen Dipikrats pro 1 Wasser hatte *E* = 0,91, 1 mg des Monopikrats *E* = 0,63. Daraus berechnet sich für 1 mg des ersten Salzes ein Gehalt von 0,705 mg Pikrinsäure, d. i. 0,295 mg Base, der demnach ein Molgew. von 195 zukommt. Vom Monopikrat enthält 1 mg 0,49 mg Base, woraus sich ein Molgew. von 215 berechnet. Das Molgewicht von Bufotenin = 204,26.

Jodmethylat der Base. Die durch Ionenaustausch des Chlorids an Al₂O₃ erhaltene Base wurde in möglichst wenig abs. Methanol gelöst und mit überschüssigem

Methyljodid versetzt. Nach wenigen Stunden kristallisierte das Jodmethylat aus, das zweimal unter Zusatz von Tierkohle aus Methanol umkristallisiert und so in farblosen Prismen vom Schmp. 210—211° erhalten wurde.

$C_{13}H_{19}ON_2J$ (346,22)	Ber. C 45,09	H 5,53	J 36,66
	Gef. » 44,88	» 5,90	» 36,55

Die Substanz stimmt im Schmp. 210—211° und in der Analyse mit Bufotenidinjodid überein.

Oxalat der Base. Die Base wurde in wenig Methanol und Äther gelöst und mit einigen Tropfen einer ätherischen Lösung von wasserfreier Oxalsäure versetzt. Dabei fiel ein zunächst öligler Niederschlag aus, der aus der eben zureichenden Menge Methanol umkristallisiert wurde. Es schieden sich feine Nadeln vom Schmp. 84—88° aus.

O-Dinitrophenylderivat. 20 mg des Mappins wurden in einigen cem Wasser, die $\frac{1}{4}$ an Methanol enthielten, aufgelöst und dann in Gegenwart von wenig 2n-Sodalösung mit einem Tropfen 2,4-Dinitrofluorbenzol, das in wenig Methanol aufgelöst war, versetzt. Nach 40 Min. langem Schütteln hatte sich eine kristalline Masse ausgeschieden, die abgesaugt und einige Male aus Aceton mit Wasser umgefällt wurde. Dabei ergaben sich dünne gelbe Nadeln vom Schmp. 173°.

$C_{18}H_{18}N_4O_5$ (370,36)	Ber. C 58,37	H 4,90	N 15,13
	Gef. » 58,44	» 4,97	» 15,27

Die gleiche Verbindung wurde auch aus Bufotenin erhalten.

Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

(Eingelaufen am 20. März 1953)

Über Formazylverbindungen I

Synthese einiger blauer Diformazane und Ditetrazoliumsalze

Von Walter Ried und Heinrich Gick*)

(Mit 1 Figur im Text)

Die von H. v. Pechmann und P. Runge¹⁾ entdeckten Tetrazoliumsalze haben vor allem durch die Arbeiten von R. Kuhn und D. Jerchel²⁾ als Indikatorsubstanzen für Reduktionsvorgänge in lebenden Zellen große Bedeutung erlangt. Die bisher beschriebenen Tetrazoliumsalze liefern bei der Reduktion in der Hauptsache mehr oder weniger intensiv rotgefärbte Formazane. Für das Studium von Reduktionsvorgängen im Blut von Menschen und Tieren war es wünschenswert, Tetrazoliumsalze zu verwenden, die bei der Reduktion in tiefgefärbte, möglichst blaue oder blauschwarze Formazane

*) Dipl.-Arbeit H. Gick, Frankfurt (Main) 1951 u. Dissertation 1953.

¹⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **27**, 2920 (1894).

²⁾ Literatur: D. Jerchel, *Fiat Reviews of Biochem.* **39**, 65 (1946); W. Ried, *Angew. Chem.* **64**, 391 (1952).