

## Die Krötengifte

Neuere Ergebnisse der chemischen und pharmakologischen Forschung

Von Dr. rer. nat. HANS BEHRINGER

Chemisches Universitätslaboratorium, München

Inhalt. — Geschichtliches. — Die Zusammensetzung der Krötenhautsekrete. — Die Konstitution der basischen und herzwirksamen Krötengifte. — Pharmakologie der Krötengifte.

Unter den tierischen Giften nehmen die des Krötenhautsekrets eine ganz besondere Stellung ein. Während die meisten Giftstoffe tierischer Herkunft eiweißähnliche Natur haben oder doch in naher Beziehung zu Aminosäuren stehen, findet sich in den Hautdrüsen der Kröten neben solchen, die chemisch dem Tryptamin nahestehen, eine Reihe stark auf das Herz wirkender Prinzipien, die sowohl ihrem chemischen Bau als auch ihrer pharmakologischen Wirkung nach mit den pflanzlichen Herzgiften der Digitalis-Gruppe, im besonderen mit denen der Meerzwiebel verglichen werden müssen.

### Geschichtliches.

Der Glaube an die Giftigkeit der Kröten ist uralte. Wie so oft, hat man auch hier schon früh die Giftwirkung mit einer Heilwirkung in Verbindung gebracht, und so finden sich seit jeher im Heilschatz vieler Völker allerlei Krötenarzneien. In einem medizinischen Lehrbuch beschreibt der griechische Arzt und Dichter Nikander<sup>1)</sup> (um 150 v. Chr.) die Wirkung eines „Krötenrankes“, die sich u. a. auch auf Herz und Atmung (!) erstreckt haben soll. Auch bei Dioskurides<sup>2)</sup> gelten die Kröten als sehr giftig, und man findet dort eine ähnliche Schilderung der Giftwirkung. Kröten dienen ihm aber auch schon zur Arzneibereitung. Bei Plinius<sup>3)</sup> und den späteren Kompilatoren<sup>4)</sup> treten solche empirisch-rationalen Züge fast vollständig zurück. In diesen Wundergeschichten und abenteuerlichen Begebenheiten spielen fast nur noch die den Kröten und ihrem Gift zugeschriebenen dämonischen und zauberischen Kräfte eine Rolle. Das ganze Mittelalter hindurch galt die Kröte als Hexen- und Teufelstier, als Krankheitsdämon, als Symbol des Geizes und Neides. Etwas nüchterner werden die Berichte erst wieder im 16. Jahrhundert. A. Paré<sup>5)</sup> teilt einige nicht unglaubliche Vergiftungsfälle durch Krötengift mit, bei denen wieder die aufgetretenen Zirkulations- und Atmungsstörungen auffallen. Im 17. und 18. Jahrhundert werden ganz allgemein in den offiziellen Arzneibüchern und Dispensatorien „Bufones exsiccati“, getrocknete Krötenhäute und Krötenpulver geführt. Vor Einführung der Digitalis durch Withering wurden sie als harntreibendes Mittel bei Wassersucht, gegen Nasenbluten und gegen viele andere Leiden gebraucht<sup>6)</sup>. Noch bis 1829 soll Krötenpulver innerlich und äußerlich gegeben worden sein. Auch in der chinesischen Medizin wird Krötengift schon lange verwendet. In dem alten Arzneibuch Pen-ts'ao kang muh (1596)<sup>7)</sup> wird das eingetrocknete Gift chinesischer Kröten, Ch'an Su oder Senso genannt, das diese Kröten beim Reizen sezernieren, als Mittel gegen Krebs, offene Wunden, Entzündungen usw. beschrieben. Ch'an Su wird heute noch in China hergestellt und verwendet.

Die ersten Tierversuche mit Krötengift machte Laurentius<sup>8)</sup> (1768). Bei Hunden beobachtete er Erbrechen und Speichelfluß. Gemminger<sup>9)</sup> glaubte, die Wirkung des Giftes mit der von Strychnin vergleichen zu können. Erst Vulpian<sup>10)</sup> bemerkte neben einer Brech- und Krampfwirkung des subkutan an Meerschweinchen und Hunde verabfolgten Krötenhautsekrets eine spezifische Wirkung auf das Herz. Frösche starben nach systolischem Herzstillstand, und er stellte auch fest, daß die Kröte gegen ihr eigenes Gift sowohl als auch gegenüber Digitalis-Substanzen sehr widerstandsfähig ist. Fornara<sup>11)</sup> war der erste, der auf Grund seiner Beobachtungen ausdrücklich auf die den Digitalis-Stoffen äußerst ähnliche Wirkung des Krötengifts hinwies. Auch alle späteren pharmakologischen Untersuchungen, die sich mit den Giften der echten Kröten befaßten, so von Kobert, Phisalix u. Bertrand<sup>12)</sup>, Gidon und vor allem von E. St. Faust<sup>13)</sup>, dann auch von Krakow u. Novaro<sup>14)</sup> haben ergeben, daß die Wirkung

der Krötengiftstoffe mit der der pflanzlichen Herzgifte der Digitalis- und Strophantus-Gruppe übereinstimmt. In letzter Zeit haben sich Gessner<sup>15)</sup> und besonders K. K. Chen u. A. L. Chen<sup>16)</sup> um die Pharmakologie der Krötengifte verdient gemacht. Handovsky<sup>17)</sup>, und seit kurzem Raymond-Hamet<sup>18)</sup>, haben sich mit den basischen Giften des Hautsekrets beschäftigt.

Die ersten chemischen Untersuchungen über Krötengift stammen von Pelletier<sup>19)</sup>. Sie haben sich, wie auch die späteren von Gratiotet u. Cloez<sup>20)</sup>, Calmets<sup>21)</sup>, sowie von Calmels<sup>22)</sup>, der glaubte, im Krötenhautsekret Methylcarbamylamin und Isocyanessigsäure gefunden zu haben, nicht bestätigen lassen. Den ersten tatsächlichen Fortschritt verdankt man E. St. Faust<sup>13)</sup>, dem es gelang, ein zwar amorphes, aber stickstoff-freies Prinzip mit starker Wirkung auf das Herz zu isolieren. Er hat auch als erster die Vermutung ausgesprochen, daß die stickstoff-freien Krötengifte ihrer Struktur nach in die Klasse der Sterine und Gallensäuren gehören. Das erste einwandfrei charakterisierte und kristallisierte herzwirksame Krötengift gewannen Abel u. Macht<sup>23)</sup> 1912 von der südamerikanischen Kröte Bufo marinus. Kurz darauf berichteten Wieland u. Weil<sup>24)</sup> über die Isolierung des kristallisierten Bufotalins aus den Hautdrüsen der einheimischen Erdkröte. Auch weiterhin waren die Arbeiten Wielands sowohl für das Gebiet der Krötenherzgifte als auch für das der basischen Giftstoffe, deren erster von Handovsky<sup>17)</sup> in kristallisierter Form erhalten wurde, richtunggebend. Mit den Giften der asiatischen Krötenarten und den Inhaltsstoffen der chinesischen Droge Senso befaßten sich die Japaner Shimizu<sup>25)</sup>, Kodama<sup>26)</sup> und vor allem Kotake<sup>26)</sup>. In Amerika bearbeiten Jensen und die beiden Chen<sup>27)</sup>, in letzter Zeit auch Deulofeu<sup>28)</sup> und Slotta<sup>29)</sup>, neben Senso in erster Linie die Gifte der in Nord- und Südamerika vorkommenden Krötenarten.

### Die Zusammensetzung der Krötenhautsekrete.

Die herzwirksamen und basischen Giftstoffe finden sich bei den Kröten in bestimmten Hautdrüsen, die sich histologisch von den über die ganze Körperoberfläche verteilten Schleimdrüsen unterscheiden. Die eigentlichen Giftdrüsen sind meist zu größeren, warzenförmigen Drüsenhaufen vereinigt. Z. B. finden sich in der Ohrgegend besonders große solcher Drüsenpakete, die man „Ohrdrüsen“ oder Parotoiden nennt. Während die Sekretion der Schleimdrüsen willkürlich vom Tier beeinflusst wird, kann es das Sekret der Giftdrüsen sozusagen nur durch „fremde Hilfe“, z. B. mit einer Pinzette, ausscheiden. Die Kröten sind also durchaus passiv giftige Tiere.

Man kennt über 130 Arten der Gattung Bufo, die mit Ausnahme Australiens über alle Erdteile verbreitet sind. Von ihnen sind bis jetzt die in Tab. 1 verzeichneten Arten bzw. Unterarten chemisch und pharmakologisch untersucht worden. In dieser Tabelle sind auch alle im Hautsekret dieser Kröten nachgewiesenen toxisch wirkenden Stoffe zusammengestellt. Wie man sieht, kommen in den meisten Fällen zwei bzw. drei verschiedene Klassen von Giftstoffen vor:

1. die stickstoff-freien herzwirksamen Bufogenine oder Bufagine und ihre Paarlinge mit Korksäure und Arginin, die sog. Bufotoxine, und
2. die Basen vom Typus des Bufotenins, Bufotenidins und Dehydrobufotenins und das schwefelhaltige Bufothionin, die sich alle vom Tryptophan ableiten, und außerdem noch Adrenalin.

<sup>1)</sup> Ἀλκυοναῖα, übersetzt von Jacques Grévin in „Deux livres des venins“, Anvers 1558.

<sup>2)</sup> Ἡερὶ ὀφθαλμῶν, übersetzt von Ant. du Pinet, Lyon 1680.

<sup>3)</sup> Hist. nat. lib. 8, 48; 32, 18.

<sup>4)</sup> Eine sehr vollständige Besprechung der alten Literatur findet sich bei U. Aldrovandi, De quadruped. digitatis lib. II p. 607, ed. Barth. Ambrosinus, Bononiae 1658.

<sup>5)</sup> Oeuvres complètes, ed. J. F. Malgaigne, Paris 1841.

<sup>6)</sup> Joh. Chr. Schröder, Pharmacopoea medico-physica, Nürnberg 1685, und Samuel Dale, Pharmacologia seu manuductio ad mat. med., ed. London 1751.

<sup>7)</sup> S. C. Li, Pen-ts'ao kang muh 1596, Kap. 42.

<sup>8)</sup> Specimen medicum etc., Vienne 1768, p. 113.

<sup>9)</sup> Illustr. Mediz. Ztg., herausg. von Rubner, Bd. I, 355 [1852].

<sup>10)</sup> C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 6, 133 [1854]; 7, 90 [1855]; Mém. Soc. Biol. 1856, 122.

<sup>11)</sup> C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 45, 474 [1893]; 54, 932 [1902]. Bei M. Phisalix: Animaux venimeux et venins, E. Mason, Paris 1922, Vol. II, findet man die meiste ältere Literatur.

<sup>12)</sup> Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 47, 279 [1902]; 49, 1 [1902].

<sup>13)</sup> O. R. Séances Biol. Filiales Associées 87, 824 [1922]; 88, 371 [1923].

<sup>14)</sup> Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 113, 343; 118, 325 [1926]; S.-B. Ges. Beförd. ges. Naturwiss. Marburg 61, 138 [1926].

<sup>15)</sup> J. Pharmacol. exp. Therapeut. 49, 561 [1933] und früher.

<sup>16)</sup> Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 86, 138 [1920].

<sup>17)</sup> C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 85, 1414 [1941]; C. R. heb. Séances Acad. Sci. 214, 506 [1942]. <sup>18)</sup> J. Méd. Chir. Pharm. etc. 40, 75 [1917].

<sup>19)</sup> C. R. heb. Séances Acad. Sci. 32, 592 [1851]; 34, 729 [1852].

<sup>20)</sup> Zitiert bei Lutembacher, Fußnote 85.

<sup>21)</sup> C. R. heb. Séances Acad. Sci. 98, 536 [1884].

<sup>22)</sup> J. Pharmacol. exp. Therapeut. 4, 319 [1912].

<sup>23)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. 46, 3315 [1913].

<sup>24)</sup> Acta Scholae med. Univ. imp. Kioto 3, 299 [1920]; 4, 213, 355 [1921/1922].

<sup>25)</sup> Sci. Pap. Inst. physiol. chem. Res. 35, 419 [1939] und früher.

<sup>26)</sup> J. Amer. chem. Soc. 59, 767 [1937] und früher.

<sup>27)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 237, 171 [1935]; Liebigs Ann. Chem. 534, 288 [1938]; Nature [Paris] 145, 671 [1940]. <sup>28)</sup> Mem. Inst. Butantan 11, 89, 101 [1937]

Daneben finden sich in den meisten Hautdrüsensekreten Cholesterin, begleitet von Provitamin D<sup>16)</sup>, Phytosterin<sup>30)</sup>, manchmal auch Ascorbinsäure, Glutathion<sup>31)</sup> u. a. Aus den älteren toxikologisch-chemischen Untersuchungen von *Phisalia*<sup>12)</sup>, *Flury*<sup>32)</sup> und anderen an den Hautsekreten der Frösche, der Geburtshelferkröte, der Unken und einiger anderer schwanzloser Amphibien geht übereinstimmend hervor, daß diese Anuren keine Genine oder Toxine produzieren. *Gessner*<sup>15)</sup> hat diese Frage in letzter Zeit erneut geprüft. Er kommt für die von ihm untersuchten in Deutschland heimischen Amphibien, die nicht zu den echten Kröten gehören, zu dem Ergebnis, daß die wirksamen Bestandteile in ihrem Hautsekret keine mit den Digitalis-Stoffen vergleichbare pharmakologische Wirkung ausüben, sondern daß es sich dabei um saponin-artige Substanzen, Eiweißabbauprodukte, Hämolyse und Agglutinine handelt, die umgekehrt im Drüsensekret der echten Kröten fehlen. Bei einem südafrikanischen Krallenfrosch, *Xenopus laevis*, hat *Jensen*<sup>33)</sup> aus dem Hautsekret die Base Bufotenin als Flavianat isolieren können, dagegen gelang es ihm nicht, Genine oder Toxine nachzuweisen.

Tabelle 1.

Krötenart und Vorkommen	Aus dem Hautsekret wurden isoliert Basische Gifte (A); Herzgifte (B)	Bearbeiter
Bufo vulgaris Laur. Europa, Nord- asien und Nord- westafrika	A. Bufotenin C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> ON <sub>2</sub> , F. 146° Pikrat, F. 178°, Oxalat F. 94° Bufotenidin als Pikrat C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> ON <sub>2</sub> · C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub> , F. 198°	<i>Handovsky</i> <sup>17)</sup> <i>Wieland</i> u. Mitarb. <sup>37, 38)</sup>
	B. Bufotalin C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> , F. 224°  Bufotalidin C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub> , F. 228° Bufotalinin C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub> , F. 233° Bufotoxin C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> · C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub> , Zers.-P. 204°	<i>Wieland</i> u. Mitarb. <sup>34, 35, 44)</sup> Dieselben <sup>46, 36)</sup> Dieselben <sup>46, 36)</sup> Dieselben <sup>39, 35)</sup>
Bufo formosus Blgr. Japan	A. Bufotenin als Flavianat, F. 187° Bufotenidin als Flavianat, F. 200° Bufothionin C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , F. 249° Adrenalin C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> , F. 211°	<i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>39, 38)</sup> <i>Chen</i> , <i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>46)</sup> <i>Wieland</i> u. <i>Vocke</i> <sup>42)</sup> <i>Chen</i> , <i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>46)</sup>
	B. Gamabufotalin (Gamabufagin, Gama- bufogenin) C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub> , F. 262°  Bufotalin (Gamabufalin), F. 224°  Gamabufotoxin C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O, Zers.-P. 210°	<i>Kotake</i> <sup>45)</sup> , <i>Wieland</i> u. <i>Vocke</i> <sup>42)</sup> , <i>Chen</i> , <i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>46, 37)</sup> <i>Kotake</i> <sup>45)</sup> , <i>Kondo</i> u. <i>Ohno</i> <sup>43)</sup> <i>Wieland</i> u. <i>Vocke</i> <sup>42)</sup> , <i>Chen</i> , <i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>46)</sup>
Bufo marinus (L) (Bufo paracnemis?) Westindien, Mexiko, Zentral- und Südamerika	A. Bufotenin als Pikrat, F. 178° Dehydrobufotenin als Pikrat, F. 189° C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> ON <sub>2</sub> · C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub> Adrenalin, F. 211°	<i>Deulofeu</i> u. Mitarb. <sup>28)</sup> <i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>39)</sup> <i>Slotta</i> u. Mitarb. <sup>29)</sup> <i>Abel</i> u. <i>Macht</i> <sup>29)</sup> , <i>Deulofeu</i> <sup>28)</sup>
	B. Marinobufagin C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub> , F. 212 bis 213° Marinobufagin C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub> , F. 205—208°? Marinobufotoxin C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O, Zers.-P. 204—206°	<i>Abel</i> u. <i>Macla</i> <sup>29)</sup> , <i>Jensen</i> <sup>27)</sup> <i>Slotta</i> u. Mitarb. <sup>29)</sup> <i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>39)</sup>
Bufo arenarum Hensel Argentinien, Uruguay, Südbrasilien	A. Bufotenin als Pikrat, F. 178° Dehydrobufotenin als Flavianat, F. 265°, und als Pikrat, F. 182° Bufothionin, F. 249° Adrenalin, F. 210°	<i>Wieland</i> u. Mitarb. <sup>34)</sup> <i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>39)</sup>
	B. Arenobufogenin C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub> , F. 252° Arenobufagin C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> , F. 220° Arenobufagin C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub> , F. 232° Arenobufotoxin C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub> , F. 204° Arenobufotoxin C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub> , Zers.- P. 194—195°	<i>Wieland</i> u. Mitarb. <sup>35)</sup> <i>Chen</i> , <i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>34, 33)</sup> <i>Deulofeu</i> <sup>28)</sup> <i>Wieland</i> u. Mitarb. <sup>35)</sup> <i>Chen</i> , <i>Jensen</i> u. <i>Chen</i> <sup>34)</sup>

Ferner wurden noch bei folgenden Arten Genine (G), Toxine (T), Basen (B) oder Adrenalin (A) gefunden:

Bufo regularis Reuss . . . . .	(G, T, B, A)	Bufo alvarius Girard . . . . .	(B, T?)
Bufo viridis Laur. . . . .	(G, T, B)	Bufo mauretanicus Schl. . . . .	(G)
Bufo valliceps Wgm. . . . .	(G, B, T)	Bufo lentiginosus (Shaw) Subsp.:	
Bufo quereicus Holbr. . . . .	(G, B)	Bufo l. fowleri Patn. . . . .	(G?, T, B)
Bufo melanostictus Schneid. . . . .	(G)	Bufo l. americanus Lec. . . . .	(B)
Giftige	A. Bufotenidin als Flavianat, F. 200°,	Wieland u. Mitarb. <sup>37)</sup>	
Inhaltsstoffe	als Pikrat, F. 198°		
der	Dehydrobufotenin als Pikrat,	Jensen u. Chen <sup>39)</sup>	
Chinesischen	F. 183° bis 184°		
Droge Ch'an Su	Adrenalin, F. 212°	Chen, Jensen u. Chen <sup>39)</sup>	
(Senso)			
B. Cinobufagin C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub> , F. 212°	Kotake u. Kuwada <sup>45)</sup>		
Cinobufotalin C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub> , F. 249°	Tschesche u. Offe <sup>47, 46)</sup>		
Gamabufotalin C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub> , F. 262°	Kotake u. Kuwada <sup>45)</sup>		
(Pseudo-desacetyl-bufotalin C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub> ?, amorph)	Kondo u. Ohno <sup>43)</sup>		
Cinobufotoxin C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub> ? (C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>11</sub> N <sub>4</sub> ), Zers.-P. 200°	Chen, Jensen u. Chen <sup>39)</sup>		

Wie Tab. 1 zeigt, finden sich die basischen Giftstoffe stets in mehreren Arten. Dagegen fällt die Artspezifität der Genine und Toxine auf. Bis heute ist nur ein sicherer Fall bekannt, wo das gleiche Genin im Sekret zweier verschiedener Arten aufgefunden wurde: Bufotalin, das Hauptgift unserer einheimischen Erdkröte, ist auch bei der japanischen Kröte *Bufo formosus* aufgefunden worden. Öfter finden sich im Hautsekret einer Krötenart mehrere Genine, die dann, je nach Menge, als Haupt- und Nebengift unterschieden werden.

Dagegen gelang es nie, mehrere Toxine bei ein und derselben Krötenart aufzufinden. Der Fall *Bufo arenarum*, für den *Chen*, *Jensen* u. *Chen*<sup>34)</sup> und *Wieland* u. Mitarb.<sup>35)</sup> zwei verschiedene Toxine aufgefunden haben, muß noch offen bleiben, da die diesen Toxinen zugrunde liegenden Genine noch nicht genauer bekannt sind.

Zur Gewinnung der Giftstoffe für die chemische Untersuchung fängt man die Kröten im Frühjahr während der Paarungszeit, wo sie sich in Teichen und Tümpeln aus der ganzen Umgegend zum Laichgeschäft versammeln. Man entnimmt ihnen dann durch Druck mit einer Pinzette auf die Ohrdrüsen das Gift, das dabei herausspritzt und in geeigneter Weise in Watte aufgefangen wird. Bei unseren „Kröten jagen“ wurden so jedesmal etwa 25000—30000 Tiere „gemolken“ und dann wieder freigelassen. Dem scharf getrockneten Sekret werden dann mit Chloroform die Genine neben Sterinen und Fett entzogen, während das Toxin zurückbleibt und nachher, zusammen mit den Basen, durch Methanol-Extraktion gewonnen wird.

Nach Abtrennen der Genine von den Sterinen und Fetten durch Fällen der Chloroform-Lösung mit Petroläther wird die Geninfraktion der chromatographischen Adsorption unterworfen, die dann zusammen mit fraktionierter Kristallisation so in dem von *Wieland*, *Hesse* u. *Hüttel*<sup>36)</sup> ausgearbeiteten Arbeitsgang in relativ kurzer Zeit und mit guter Ausbeute die Reindarstellung der drei Genine Bufotalin, Bufotalinin und Bufotalidin erlaubt. Aus dem die Basen und das Toxin enthaltenden Methanol-Extrakt kann nach dem Verjagen des Lösungsmittels und Aufnehmen in Alkohol durch Fällen mit Chloroform das Toxin von den Basen abgetrennt werden. Ersteres kann durch Chromatographie und Kristallisation aus verd. Alkohol gereinigt werden, während Bufotenin sich durch Äther-Extraktion von seinem Begleiter Bufotenidin abtrennen und durch Hochvakuum-Sublimation rein gewinnen läßt. Bufotenidin ist nur in Form seiner Salze mit Pikrinsäure, Flaviansäure usw. kristallisiert erhalten worden.

Aus dem Sekret eines Tieres erhält man 2—3 mg herztögtiger Substanzen (von den Weibchen etwas mehr) und nur rd. 0,1 mg der basischen Giftstoffe<sup>35)</sup>.

## Die Konstitution der basischen und herzwirksamen Krötengifte.

### A. Die Krötenbasen.

Auf Grund der ersten analytischen Befunde an den Salzen des Bufotenins und da es die Fichtenspanreaktion und die für Indol-Derivate charakteristische Farbreaktion mit Glyoxylsäure nach *Adamkiewicz*, *Hopkins* u. *Cole* gibt, wurde *Wieland* zu der auch aus biologischen Gründen naheliegenden Vermutung einer engen Strukturverwandtschaft der Krötenbasen mit Tryptophan geführt.

Bufotenin enthält nur ein ausgesprochen basisches Stickstoff-Atom, da es in ätherischer Lösung nur ein Mol Methyljodid zum Bufoteninjodmethylat aufnimmt. Die freie quartäre Base spaltet leicht Trimethylamin ab und erwies sich als identisch mit dem erstmals von *Wieland*, *Hesse* u. *Mittasch*<sup>37)</sup> im Senso und später auch in einigen anderen Krötenhautsekreten aufgefundenen Bufotenidin. Nach diesem Übergang Bufotenin—Bufotenidin mußte man annehmen, daß Bufotenin ein Betain ist. Wegen dieser gegenseitigen Beziehung der beiden Krötenbasen und der Analysen der Salze von Bufotenin und Bufotenidin glaubte *Wieland*, daß dem Bufotenin die Konstitution des am Indol-Stickstoff methylierten N-Dimethyl-tryptophans zukommt. Bufotenidin war dann als das entsprechende Betain aufzufassen. Jedoch ließen schon die Eigenschaften des synthetisch dargestellten N-Methyl-tryptophans — es fehlt die für die basischen Krötengifte so charakteristische Pyrrol-Reaktion — auf keinen nahen Zusammenhang solcher Verbindungen mit Bufotenin schließen. Da sich schließlich die thermische Abspaltung von Kohlendioxyd in keiner Weise erreichen ließ und es inzwischen *Wieland*, *Konz* u. *Mittasch*<sup>38)</sup> gelungen war, für Bufotenin aus der Analyse der kristallisiert erhaltenen freien Base die richtige Summenformel zu C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>ON<sub>2</sub> zu ermitteln, wurde die Aminosäure-Formel endgültig aufgegeben. *Jensen* u. *Chen*<sup>39)</sup> waren kurz zuvor aus pharmakologischen Überlegungen — das Betain des Tryptophans besitzt im Gegensatz zu Bufotenin keine Wirkung auf den Blutdruck — zu der Ansicht gekommen, Bufotenin sei ein Tryptamin-Derivat, eine Vermutung, die dann auch von *Wieland* experimentell bestätigt wurde.

<sup>30)</sup> R. Hüttel u. H. Behringer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **245**, 175 [1937].

<sup>31)</sup> J. Zinnmet u. Dubois-Ferrière, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **123**, 654 [1938].

<sup>32)</sup> Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **81**, 319 [1917]; Naturwiss. **7**, 613 [1919].

<sup>33)</sup> J. Amer. chem. Soc. **57**, 1705 [1935].

<sup>34)</sup> J. Pharmacol. exp. Therapeut. **49**, 1 [1933].

<sup>35)</sup> H. Wieland u. H. Behringer, Liebigs Ann. Chem. **549**, 209 [1941].

<sup>36)</sup> Ebenda **524**, 203 [1936].

<sup>37)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. **64**, 2099 [1931].

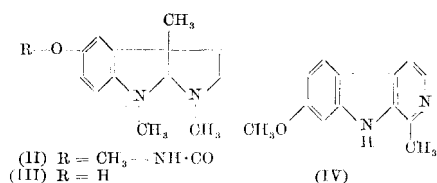
<sup>38)</sup> Liebigs Ann. Chem. **513**, 1 [1934].

<sup>39)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1310 [1932].

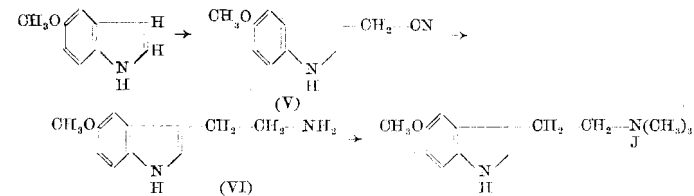
Die schwach saure Natur des Bufotenins konnte jetzt durch eine phenolische OH-Gruppe bedingt sein, was auch scharf bewiesen werden konnte. Einmal ließ sich Bufotenin mit Methyljodid erschöpfend methylieren. Die quartäre Base enthielt jetzt Methoxyl, und das Jodid dieser Base ließ sich auch aus Bufotenidin durch Methylierung mit Dimethylsulfat (O-Methyl-bufotenidin) darstellen. Andererseits gibt Bufotenin eine Eisen(III)-chlorid-Reaktion und kann in ein Diacetyl-Derivat übergeführt werden, dessen Acetyl-Gruppen sich getrennt bestimmen lassen, da die eine leicht, die andere schwer abgespalten wird. Man konnte dabei annehmen, daß außer der Hydroxyl-Gruppe noch der Stickstoff des Indol-Rings acetyliert worden war und Bufotenin damit in Einklang zwei aktive Wasserstoff-Atome enthält. Der Indol-Stickstoff ist somit, wie die phenolische OH-Gruppe, nicht substituiert. Da die Gruppierung am basischen Amino-Stickstoff durch die

Beziehung Bufotenin—Bufotenidin geklärt war, führten diese Ergebnisse *Wieland* u. Mitarb.<sup>38)</sup> in Übereinstimmung mit der Annahme von *Jensen* u. *Chen* zur Aufstellung von Formel (I) für Bufotenin.

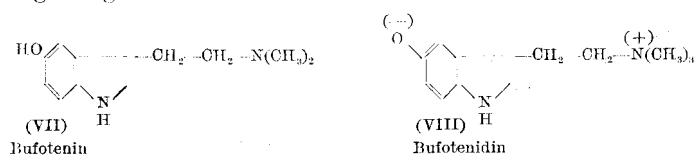
Wegen der positiven Farbreaktion mit Glyoxylsäure mußte die  $\alpha$ -Stellung im Indol-Ring dieses Oxy-N-dimethyl-tryptamins unbesetzt sein, die Seitenkette also, wie angenommen, in  $\beta$ -Stellung angreifen. Dagegen war der Haftort des phenolischen Hydroxyls erst noch zu bestimmen. Diese schwierige Frage wurde auf synthetischem Weg gelöst. Bei der zu erwartenden Zersetzlichkeit der damals noch unbekannten Oxy-indole wurde die Synthese des oben erwähnten O-Methyl-bufotenidins versucht. In (I) sind als Haftstellen für die Hydroxyl-Gruppe die Kohlenstoff-Atome 4, 5, 6 und 7 möglich. In der Natur kommen Indol-Derivate mit Substitution in 4 oder 7 nicht vor, wohl aber Derivate des 5- und 6-Oxy-indols. Physostigmin (II), ein Urethan des Eserolins (III), leitet sich vom



5-Oxy-indol ab. Abkömmlinge des 6-Oxy-indols sind die Harmala-Alkaloide. Im Harmin (IV) ist die OH-Gruppe methyliert. *Wieland* nahm daher an, daß im Bufotenin entweder ein 5- oder 6-Oxy-N-dimethyl-tryptamin vorliegt, und versuchte zuerst die Synthese der in 6-Stellung durch Methoxyl substituierten quartären Base. Deren Jodid erwies sich aber als verschieden vom O-Methyl-bufotenidin-jodid. Man wandte sich nun der Synthese des anderen Isomeren zu und stellte zuerst das 5-Methoxy-indolylamin (V) auf folgendem Weg her. Die Grignard-Verbindung des 5-Methoxy-indols liefert nach der Methode von *Majima* mit Chloracetonitril das Nitril (V), dessen Reduktion mit Natrium und Alkohol (VI) ergibt. Die



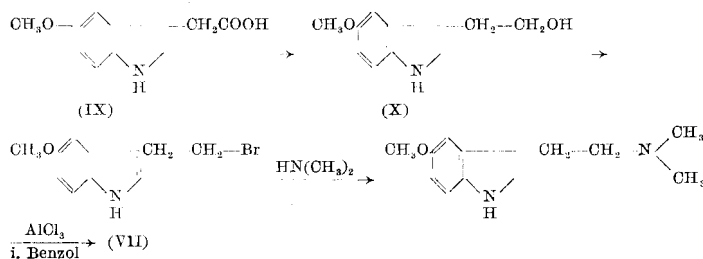
erschöpfende Methylierung des 5-Oxy-indolyl- $\beta$ -äthylamins führte zu einem Jodmethylat, das mit O-Methyl-bufotenidin-jodid identisch war, ebenso wie die Pikrate und Flavinate der quartären Basen. Bufotenin war damit als 5-Oxy-indolyl-äthyl-dimethylamin (VII) und Bufotenidin (VIII) als das zugehörige Phenolbetain erkannt worden.



*Hoshino* u. *Shimodaira*<sup>40)</sup> haben schließlich das Bufotenin selbst aus 5-Methoxy-(bzw. Äthoxy-)indolyl-(3)-essigsäure (IX) über die entsprechenden 5-Alkoxy-tryptophole (X) und Bufoteninmethyl-(bzw. -äthyl-)äther synthetisiert, indem sie letztere mit Aluminiumchlorid in Benzol spalteten.

Während man für die Bildung der 6-Oxy-indol-Körper in der Zelle ohne Zweifel Tyrosin als Muttersubstanz ansehen darf, ist

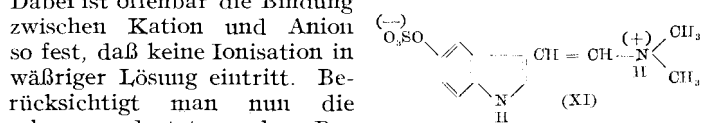
eine physiologische Ableitung der 5-Oxy-indol-Körper, von denen bisher die basischen Krötengifte und das Physostigmin aus den Samen von *Physostigma venenosum* (Calabarbohnen) als einzige



natürliche Vertreter bekannt sind, etwa aus 3,4-Dioxy-phenylalanin unwahrscheinlich. *Wieland* denkt vielmehr an einen möglichen Zusammenhang der biologischen Synthese der beiden Oxy-indol-Körper mit der Entstehungsweise der Homogentisinsäure (Alkapton), die ebenfalls ein phenolisches Hydroxyl in meta-Stellung zur Seitenkette trägt.

Diese eben genannte strukturelle Beziehung zwischen den tierischen Alkaloiden aus dem Krötenhautsekret und dem Alkaloid aus den Calabarbohnen hat bemerkenswerterweise eine biochemische Parallele gefunden. *Sobotka* u. *Antopol*<sup>41)</sup> fanden vor kurzem, daß Bufotenin qualitativ und quantitativ die gleiche hemmende Wirkung auf Cholinesterase ausübt wie Physostigmin, das bisher als der spezifische Hemmstoff dieses Enzyms angesehen wurde.

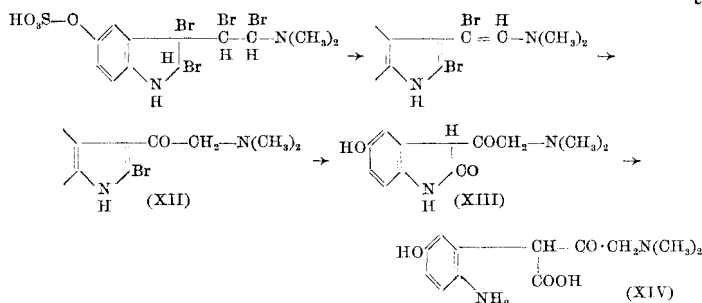
Neben Bufotenin und seinem Methylbetain kommt im Hautsekret mancher Krötenarten und im Senso noch eine weitere Base, in Bindung an Schwefelsäure, vor. Sie wurde zum erstenmal von *Wieland* u. *Voche*<sup>42)</sup> aus dem Hautsekret der japanischen Kröte *Bufo formosus* isoliert und erhielt den Namen Bufothionin. *H. Wieland* u. *Th. Wieland*<sup>43)</sup>, denen es vor einiger Zeit gelang, seine Konstitution aufzuklären, fanden seine Zusammensetzung zu C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Bufothionin erwies sich als vollkommen neutrale Substanz, die sich weder in Säuren noch in Alkalien löst und beim Erwärmen mit verd. Salzsäure Schwefelsäure abspaltet, wobei sie in das Chlorhydrat einer Base C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>ON<sub>2</sub> übergeht. Der Zusammensetzung nach unterscheidet sich letztere vom Bufotenin nur durch das Fehlen zweier Wasserstoff-Atome. Dieses Dehydrobufotenin wurde auch mehrfach als Begleiter des Bufothionins in Krötenhautextrakten aufgefunden. Der nahe strukturelle Zusammenhang dieser „Spaltbase“ des Bufothionins mit Bufotenin ging sowohl aus der positiven Indol-Reaktion nach *Hopkins* u. *Cole* als auch aus der Färbung mit Eisen(III)-chlorid hervor, die auf ein phenolisches Hydroxyl hinwies, während Bufothionin selbst keine Eisenchlorid-Reaktion gibt. Beim Behandeln des Bufothionins mit Mineralsäuren mußte also einmal eine phenolische OH-Gruppe, die offenbar vorher durch Veresterung mit Schwefelsäure blockiert gewesen war, freigelegt worden sein, gleichzeitig aber auch eine basische Gruppe, wie aus der Natur des Spaltstücks hervorgeht. In diesem Verhalten gleicht das Bufothionin ganz der Amino-äthylschwefelsäure, die sich ebenfalls als säure- und alkaliumlöslicher Neutralkörper erweist, deren Schwefelsäure-Rest beim Erhitzen mit verd. Salzsäure hydrolytisch abgespalten wird. Bufothionin erscheint hiernach als Sulfobetain eines Phenylschwefelsäureesters, das man als Zwitterion formulieren kann (vgl. XI). Dabei ist offenbar die Bindung zwischen Kation und Anion so fest, daß keine Ionisation in wäßriger Lösung eintritt. Berücksichtigt man nun die schon angedeuteten nahen Beziehungen des Dehydrobufotenins zu Bufotenin und deren gemeinsames Vorkommen zusammen mit Bufothionin in manchen Hautsekreten, so war es naheliegend, dem Dehydrobufotenin die Formel eines in der Seitenkette dehydrierten Bufotenins und damit dem Bufothionin dann Formel (XI) zuzuerteilen. Daneben war aber eine andere Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß nämlich durch geringfügige Verschiebung, ähnlich wie im Eserolin (III), ein zweiter heterocyclischer Ring vorlag, was zunächst nicht unwahrscheinlich schien, da frühere Versuche, die Spaltbase des Bufothionins zu Bufotenin zu hydrieren, immer erfolglos waren. *H. Wieland* u. *Th. Wieland* erhielten dann aber bei der Permanganat-Oxydation von Bufothionin Dimethylamin und Ameisensäure, die durch hydrolytische Spaltung von N-Dimethyl-formamid gebildet wurden, das, wenn Formel (XI) richtig war, dabei eigentlich entstehen



<sup>41)</sup> Enzymologia [Den Haag] **4**, 189 [1937]. <sup>42)</sup> Liebigs Ann. Chem. **481**, 215 [1930].  
<sup>43)</sup> Ebenda **528**, 234 [1937].

sollte. Da auch der Verlauf der erschöpfenden Methylierung der Dehydrobase schließlich auf die tertiäre und aliphatische Natur des basischen Stickstoffs hinwies, versuchten sie die im Bufothionin angenommene Doppelbindung mit Brom nachzuweisen bzw. einen Brom-Abbau durchzuführen.

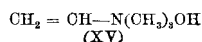
Dieser Abbauversuch, der unter Brom-Anlageung und gleichzeitiger Eliminierung von Bromwasserstoff und hydrolytischer Wiederabspaltung eines Brom-Atoms verläuft, führt zu einem gelben Brom-Körper (XII), der weder die Fichten-spanreaktion noch die Reaktion nach *Hopkins* u. *Cole* und auch keine Eisenchlorid-Reaktion mehr gibt. Durch Behandeln mit



verd. Bromwasserstoffsäure lassen sich aus ihm das Brom-Atom und der Schwefelsäure-Rest hydrolytisch abspalten, und man gelangt zu einem Oxindol-Derivat (XIII), das durch Alkali zur offenen Säure (XIV) aufgespalten werden kann. Diese läßt sich diazotieren und mit  $\beta$ -Naphthol zu einem Farbstoff kuppeln. Durch Säuren wird sie wieder zu (XIII) cyclisiert.

Nachdem diese experimentellen Befunde durchaus im Sinne der Formulierung (XI) für Bufothionin erklärt werden konnten, gelang es schließlich, die Bedingungen aufzufinden, unter welchen sich das Dehydrobufotenin zu Bufotenin hydrieren läßt. In schwach salzsaurer Lösung wird das Chlorhydrat der Bufothionin-Spaltbase mit der theoretisch notwendigen Menge Wasserstoff katalytisch zu Bufotenin hydriert, das in Form des Pikrats und Jodmethylats identifiziert wurde.

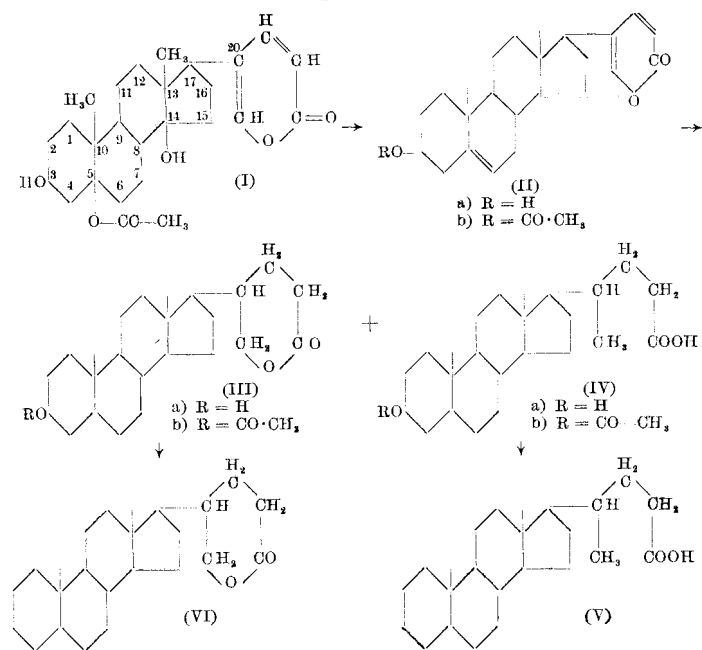
Bufothionin ist somit als ein inneres Salz des Schwefelsäureesters von 5-Oxy-indolyl- $\beta$ -vinyl-dimethylamin erkannt worden. Die Veresterung der Phenol-Gruppe hat ihr Vorbild in der Phenylschwefelsäure und im Harnindican. Die ungesättigte basische Seitenkette findet ihr Analogon in dem biogenen Amin Neurin (XV).



## B. Die herzwirksamen Krötengifte.

Da die Kröten-Genine und Toxine miteinander große Ähnlichkeit in der Zusammensetzung und ihren sonstigen chemischen Eigenschaften haben, soll zunächst das ihnen allen gemeinsame Bauprinzip erläutert werden.

Das ist erstens ihre Zugehörigkeit zur Klasse der Steroide, wie schon *Faust*<sup>13)</sup> vermutet hatte. *Wieland*, *Hesse* u. *Meyer*<sup>44)</sup> haben dementsprechend versucht, das Bufotalin



<sup>44)</sup> Ebenda 493, 272 [1932].

zu einem Gallensäure-Derivat abzubauen. Der leichteren Übersicht halber sei die für das Bufotalin jetzt geltende Strukturformel (I) vorweggenommen. Aus dem am Hydroxyl an C<sub>3</sub> acetylierten Bufotalin spalteten sie mit konz. Salzsäure je 1 Mol Wasser und Essigsäure ab; es entsteht ein vierfach ungesättigter Körper, das 3-Acetylbufotalin (IIb). Bei der katalytischen Hydrierung geht es unter Aufnahme von mehr als 4 Mol Wasserstoff in ein Gemisch saurer und neutraler gesättigter Substanzen über, aus dem sich neben dem 3-Acetoxybufotalin (IIIb), auf das nachher zurückgekommen wird, eine Acetoxy-cholansäure (VIb) abtrennen ließ. Der doppelt ungesättigte Lacton-Ring wurde also in einem Teil der Reaktion unter Reduktion der enolischen Gruppe bis zu Methylhydrierend aufgespalten.

Dies ist eine allgemeine Eigenschaft ungesättigter  $\delta$ -Lactone. Nach der Verseifung der Acetoxy-cholansäure wurde die Oxy-säure durch Wasserabspaltung in eine Cholensäure verwandelt. Bei der katalytischen Hydrierung geht sie in eine Cholansäure (V) über, die aber mit keiner der bekannten Cholansäuren identisch ist.

Durch die Arbeiten von *Stoll* u. Mitarb.<sup>45)</sup> war später die Konstitution der pflanzlichen Herzgifte der Meerzwiebel-Gruppe bekanntgeworden. Er konnte den wichtigsten Giftstoff der Meerzwiebel

Scilla maritima, das Scillaren A (VII) zum hydroxylfreien Grundlacton, dem  $\alpha$ -Scillan (VIII), abbauen; daneben hatte er noch, in Analogie zur Bildung der Acetoxybufocholansäure bei der Hydrierung des Acetylbufotaliens, eine Säure erhalten, die sich in diesem Fall als identisch mit Allocholansäure (IX) erwies.

Auch der Versuch, die Krötenherzgifte an die chemisch so sehr ähnliche Gruppe der Scilla-Glykoside anzuschließen, blieb ohne Erfolg<sup>46)</sup>. Die Überführung der bei der katalytischen Hydrierung des Bufotaliens (IIa) entstehenden beiden diastereomeren Oxybufotalane (IIIa) in die hydroxylfreien Grundlactone (VI) ergab wiederum zwei von  $\alpha$ -Scillan verschiedene Körper.

Wenn auch die Versuche, das Bufotalin mit den Gallensäuren oder mit der Gruppe der pflanzlichen Herzgifte vom Typ des Scillarens A in Beziehung zu setzen, mißglückt sind, so braucht doch die Hypothese von der Steroid-Natur der Krötengifte nicht aufgegeben zu werden. Denn es ist naheliegend, die Verschiedenheit beide Male auf Stereoisomerie statt auf Strukturisomerie zurückzuführen, da noch lange nicht alle sterisch möglichen Cholensäuren und Scillane bekannt sind.

Eine überzeugende Stütze für die Steroid-Natur der Krötenherzgifte wurde durch das Ergebnis der Selen-Dehydrierung verschiedener Krötengenine beigebracht. *Wieland* u. *Hesse*<sup>46)</sup> haben zuerst aus Bufotalin Chrysen erhalten. Später haben dann *Tschesche* u. *Offe*<sup>47)</sup> und *Jensen*<sup>48)</sup> aus dem Gemisch von Cinobufagin und Cinobufotalin, den wichtigsten Geninen der chinesischen Droge Senso, und kürzlich *Jensen*<sup>27)</sup> auch aus Marinobufagin, das  $\gamma$ -Methyl-cyclopentenophenanthren (X) erhalten. Diese Kohlenwasserstoffe entstehen bekanntlich auch aus Sterinen und Gallensäuren bei der Selen-Dehydrierung, das Chrysen bei etwas höherer Reaktionstemperatur.

Der zweite charakteristische Bestandteil aller bisher untersuchten Genine und Toxine ist, wie *Wieland*, *Hesse* u. *Hüttel*<sup>36)</sup> zuerst am Bufotalin und einigen anderen Geninen fanden, ein doppelt ungesättigter  $\delta$ -Lacton-Ring als Seitenkette am Cholan-Ringsystem. Er ist die Ursache der für alle bislang geprüften Genine gleichen charakteristischen Absorptionsbande im Ultraviolett bei 300 m $\mu$ . Diese Bande entspricht dem

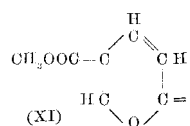
<sup>45)</sup> *Stoll*, *Hoffmann* u. *Helfenstein*, *Helv. chim. Acta* **18**, 644 [1935].

<sup>46)</sup> *Leibigs Ann. Chem.* **517**, 22 [1935].

<sup>47)</sup> *Ber. dtsch. chem. Ges.* **68**, 1998 [1935].

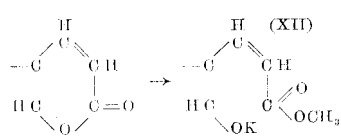
<sup>48)</sup> *J. Amer. chem. Soc.* **57**, 2733 [1935].

Chromophor der drei konjugierten Doppelbindungen in diesem Lacton-Ring und findet sich auch bei den Herzgiften der Meerzwiebelgruppe und beim Cumalinsäureester (XI).



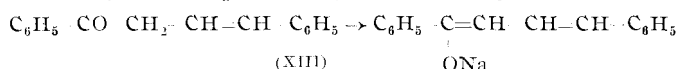
Ein weiteres Beweismoment für das Vorhandensein des doppelt ungesättigten  $\delta$ -Lacton-Ringes in den Kröten-Geninen bildet die Ozon-Spaltung, die ebenfalls von *Wieland* u. Mitarb.<sup>45,46</sup> zuerst am Acetyl-Derivat des Bufotalins (Ib) durchgeführt wurde. Neben Ameisensäure, die durch Ablösung des das Enolhydroxyl tragenden Kohlenstoff-Atoms entsteht, fand man Glyoxylsäure, die durch die Reaktion von *Hopkins* u. *Cole* nachzuweisen war. *Jensen*<sup>48</sup>) fand dann später bei der Ozonisation des Cinobufagin- und -bufotalin-Gemisches und beim Marinobufagin neben Oxalsäure ebenfalls Glyoxylsäure, die er hier als Dinitrophenylhydrazon fassen konnte. Schließlich wurde von *Kotake*<sup>49</sup>) am acetylierten Gamabufotalin und von *Kondo*<sup>51</sup>) am Acetyl-pseudo-desacetyl-bufotalin der gleiche Befund erhoben.

Ein weiteres wichtiges Argument für den Bau des Lacton-Ringes ergibt der Verlauf seiner Aufspaltung mit methylalkoholischem Kali, den gleichfalls *Wieland*, *Hesse* u. *Hüttel*<sup>50</sup>) an den Geninen von *Bufo vulgaris* untersucht haben. In Analogie zum Scillaren A und Scillaridin A wird dabei der



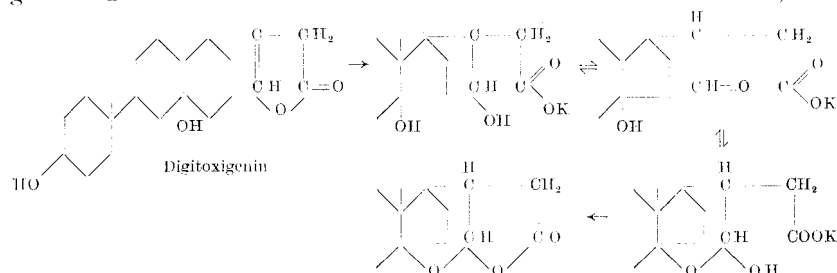
Lacton-Ring zum Kaliumenolat eines Carbonsäureesters aufgespalten (XII)-

Das Bemerkenswerte an dieser Reaktion ist also die Veresterung des Carboxyls im Augenblick der Öffnung des Lactons. Daß in diesen Fällen die Enol-Gruppierung beständig ist, geht auf das Konjugationsbestreben der Doppelbindungen zurück, wie das schon von *Thiele* für  $\beta,\gamma$ -ungesättigte Aldehyde und Ketone vorhergesagt und von *Wieland* u. *Stenzl*<sup>50</sup>) am Beispiel des Phenyl-isocrotophenons (XIII) bestätigt wurde. Beim



Nebengift Bufotalinin aus *Bufo vulgaris* gelang es sogar, das freie Enol, den farblosen Bufotalininsäuremethylester, zu fassen. Er zeigt dasselbe Absorptionsspektrum wie die Stammsubstanz.

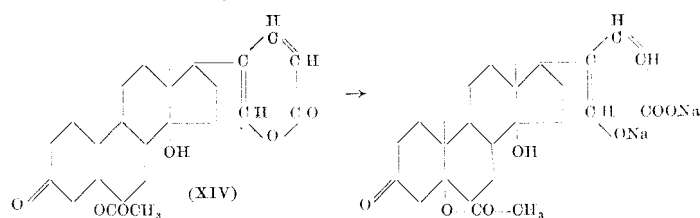
Bei den nur 23 C-Atome enthaltenden Herzgiften der Digitalis-Gruppe verläuft die alkalische Aufspaltung des hier einfach ungesättigten Lacton-Ringes, wie *Jacobs*<sup>51</sup>) gezeigt hat, ganz anders:



Die freie Aldehyd-Gruppe bildet mit dem am C-Atom 14 befindlichen tertiären Hydroxyl ein Halbacetal, die Carboxyl-Gruppe lactolisiert sich mit dem freien Acetalhydroxyl, und es entsteht so — wieder unter Wasseraustritt — eine mit der Muttersubstanz isomere Verbindung, das sog. Isogenin. Voraussetzung für das Eintreten dieser Isomerisierung ist also die Existenz einer reaktionsfähigen und räumlich in richtigem Abstand vom Lacton-Ring befindlichen Hydroxyl-Gruppe an C<sub>14</sub>.

Umgekehrt kann man also aus der Aufspaltung des Lacton-Ringes auch auf das Vorhandensein einer tertiären Hydroxyl-Gruppe an C<sub>14</sub> schließen. Diese Bildung eines Oxido-Ringes bei der Alkali-Behandlung zeigen nun nicht nur die pflanzlichen Herzgifte der C<sub>23</sub>-Reihe, sondern auch das Scillaren A und Scillaridin A und zahlreiche Kröten-Genine. So z. B. öffnet das Keton Bufotalon (XIV), das man durch Dehydrierung der sekundären OH-Gruppe an C<sub>9</sub> im Bufotalin mit Chromsäure erhält, nach *Wieland* u. *Hesse*<sup>46</sup>) in Pyridin mit wäßrigem Alkali ebenfalls den Lacton-Ring. (Hier kann natürlich keine Veresterung der Carboxyl-Gruppe eintreten.) Beim Ansäuern er-

hält man eine kristallisierte Säure, die isomer mit dem Ausgangsmaterial ist, im Gegensatz zu diesem aber keine Aldehyd-Reak-



tionen mehr gibt. Die Aldehyd- oder Enol-Gruppe ist also unter Bildung eines Oxido-Ringes verschlossen worden. Die im Bufotalin vorhandene freie tertiäre Hydroxyl-Gruppe wird aus diesen Gründen an das C-Atom 14 verlegt. Die andere, wie noch zu zeigen ist, ebenfalls tertiäre OH-Gruppe des Bufotalins kann für die Enoläther-Gruppierung nicht in Frage kommen, da sie ja ursprünglich durch den Acetyl-Rest verschlossen ist und dieser während der Isomerisierungsreaktion erhalten bleibt.

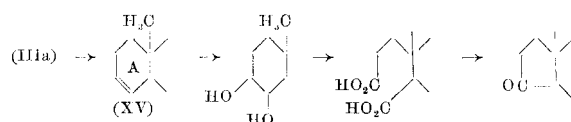
In Analogie zum Bufotalon verläuft die Alkali-Spaltung des Bufotalidins<sup>50</sup>), des Gamabufotalins<sup>52</sup>) und sehr wahrscheinlich auch des Cinobufagons<sup>26</sup>) ebenfalls unter Öffnung des Lacton-Ringes und anschließender Ausbildung eines Oxido-Ringes. Diese drei Kröten-Genine enthalten somit auch eine tertiäre Hydroxyl-Gruppe an C<sub>14</sub> des Cholan-Gerüsts.

Nachdem Ergebnis der alkalischen Aufspaltung muß man in Analogie zum Scillaren A und den anderen pflanzlichen Herzgiften und Steroiden nun auch die Haftstelle der Lacton-Seitenkette am kondensierten Ringsystem an das C-Atom 17 verlegen. Ebenso muß diesem Kohlenstoff-Atom die gleiche Konfiguration wie dort zukommen, denn Aglykone und Glykoside der C<sub>23</sub>-Herzgiftgruppe mit entgegengesetzter Konfiguration an diesem C-Atom geben, wie an mehreren Beispielen von *Jacobs*<sup>53</sup>) und *Tschesche*<sup>54</sup>) gezeigt wurde, wegen der zu großen Entfernung der fraglichen Gruppen, mit Alkali keine Isoverbindungen.

Die Grundkörper der Kröten-Genine und der Meerzwiebel-Aglykone unterscheiden sich also von den Aglykonen der anderen pflanzlichen Herzgifte mit nur 23 Kohlenstoff-Atomen und einem ungesättigten  $\gamma$ -Lacton-Ring um ein C-Atom, das am Aufbau des doppelt ungesättigten Lacton-Ringes teilnimmt. Die erwähnte Artspezifität der Kröten-Genine wird nun, wie bei den pflanzlichen Geninen, soweit nicht etwa sterische Unterschiede im Steroid-Gerüst vorhanden sind, durch die verschiedene Zahl und Stellung von Hydroxyl- und Acetyl-Gruppen, manchmal auch durch zusätzliche Doppelbindungen im Vierringgerüst verursacht. Jedoch ist es bis heute noch nie gelungen, zwei Genine ineinander oder in ein gemeinsames Derivat überzuführen. Deshalb sollen im folgenden für die wichtigsten Genine noch die Gründe erörtert werden, die für die Verteilung der OH-Gruppen bzw. Doppelbindungen im Gerüst maßgebend waren.

Für die Stellung der sekundären Hydroxyl-Gruppe am C-Atom 3 des Bufotalins, das von allen Geninen am eingehendsten untersucht wurde, war zunächst die Analogie zu den zahlreichen Alkoholen der Steroid-Gruppe, für die sie genau bewiesen ist, maßgebend. Diese Annahme konnte nun kürzlich<sup>55</sup>) durch die oxydative Aufspaltung von Ring A des Bufotalins sichergestellt werden.

Die beiden erwähnten stereoisomeren Oxybufotalane (IIIa) wurden durch Wasserabspaltung in die entsprechenden Bufotalene (XV) übergeführt. Diese konnten mit Osmiumtetroxyd



nach der Methode von *Criegee* über die Osmiumsäureester in die beiden Glykole übergeführt werden. Mit Bleitetraacetat ließen sie sich zu den entsprechenden Dicarbonsäuren aufspalten. Unter Verlust von Kohlendioxyd und Wasser gingen

<sup>45</sup>) B. *Kotake* u. K. *Kuwada*, Sci. Pap. Inst. phys. chem. Res. **32**, 79 [1937].

<sup>46</sup>) Ber. dtsch. chem. Ges. **40**, 4825 [1907].

<sup>47</sup>) *Jacobs* u. *Collins*, J. biol. Chemistry **61**, 387 [1924].

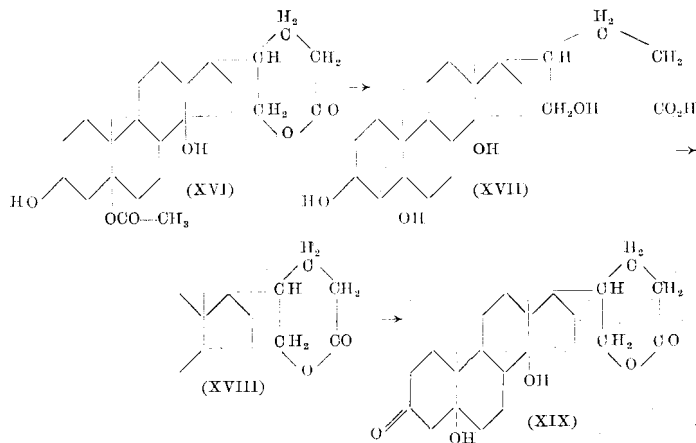
<sup>48</sup>) M. *Kotake* u. T. *Kubota*, Sci. Pap. Inst. phys. chem. Res. **34**, 824 [1938].

<sup>49</sup>) J. biol. Chemistry **61**, 387 [1924].

<sup>50</sup>) Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 654 [1938].

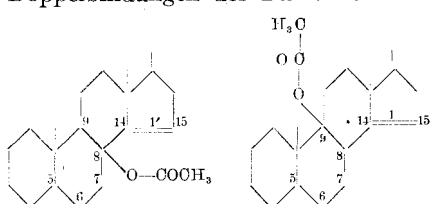
diese beim Erhitzen auf 290° im Stickstoff-Strom in cyclische Ketone über. Wie man aus der Chemie der Gallensäuren weiß, können so nur Dicarbonsäuren reagieren, die durch Öffnung des Rings A des kondensierten Ringsystems entstanden sind<sup>56)</sup>. Die festzulegende sekundäre OH-Gruppe befindet sich also an diesem Ring. Allerdings sind mit diesen Umsetzungen auch neben C<sub>3</sub> noch C<sub>2</sub> und C<sub>4</sub> als Haftstellen für das Hydroxyl vereinbar. Da aber bei Naturstoffen jedes Beispiel für einen solchen Haftort fehlt, ist C<sub>3</sub> gemäß Formel (Ia) als gesichert anzusehen.

Im Bufotalin ist nun noch die Position der acetylierten Hydroxyl-Gruppe zu bestimmen. Wegen seiner leichten Herauspalbarkeit als Essigsäure unter Aufrichtung einer Doppelbindung [Übergang Bufotalin (I) in Bufotalien (II)] hat man schon früher angenommen, daß diese mit einem tertiären Hydroxyl verestert ist. Es bleiben dann noch die Haftstellen 5, 8 oder 9, u. U. auch 7 übrig, weil Hydroxyl an dieser Stelle ebenfalls unter Säureeinwirkung leicht abgespalten wird. Diese letztere Stellung konnte nun ausgeschlossen werden, indem die tertiäre Natur des acetylierten Hydroxyls bewiesen wurde<sup>56)</sup>. Die katalytische Hydrierung von Bufotalin liefert zwei stereoisomere Tetrahydrobufotaline (XVI); sie lassen sich durch Alkali zu den entsprechenden Oxyensäuren (XVII), die gleich-



zeitig an der Acetyl-Gruppe verseift sind, aufspalten. Durch Erhitzen auf 150° konnte eine der Säuren unter Wasserabspaltung in das Lacton (XVIII) zurückverwandelt werden. Letzteres unterscheidet sich von Tetrahydrobufotalin nur durch das Fehlen der Acetyl-Gruppe. Dieses Trioxybufotalin liefert bei der Chromsäure-Oxydation nur ein Monoketon (XIX). Daraus geht hervor, daß das freigelegte Hydroxyl ebenfalls tertiär gebunden ist. Daß dies auch für das OH an C<sub>14</sub> im Bufotalin zutrifft, wurde schon früher durch dessen Oxydation zum Monoketon Bufotalon bewiesen und wird nun erneut bestätigt.

Für den Standort der Acetyl-Gruppe bleiben nach dem Gesagten also nur noch die Möglichkeiten C<sub>5</sub>, C<sub>8</sub> und C<sub>9</sub> übrig. Maßgebend für die Entscheidung zwischen diesen drei Stellen ist die Beschaffenheit der zwei Doppelbindungen im Bufotalien (IIa), das, wie oben erwähnt, durch Einwirkung von konz. Salzsäure auf Bufotalin unter Abspaltung von Essigsäure und Wasser entsteht. Die beiden Doppelbindungen sind leicht katalytisch hydrierbar, und sie sind auch nicht konjugiert zueinander, da sie im Ultraviolett-Spektrum keinen optischen Effekt ausüben. Aus der Steroid-Chemie weiß man, daß die Lage 14—15 einer Doppelbindung im Cholan-Ringsystem einen stabilen Endzustand darstellt, der durch katalytische Einwirkung von Salzsäure von anderen Lagen her eingenommen wird, und daß außerdem diese Doppelbindung leicht abhydriert wird. Es ist somit sicher, daß eine der beiden Doppelbindungen des Bufotaliens an dieser Stelle steht.



Würde die zweite Doppelbindung durch Abspaltung von Essigsäure von C<sub>8</sub> aus hervorgehen, so kommen die beiden Lagen 8—9 oder 7—8 in Frage, dann hätte man aber

in beiden Fällen ein konjugiertes System, und außerdem wäre ihre katalytische Hydrierung nach den bisherigen Erfahrungen ausgeschlossen, und damit auch C<sub>8</sub> für die Stellung des Acetoxyls.

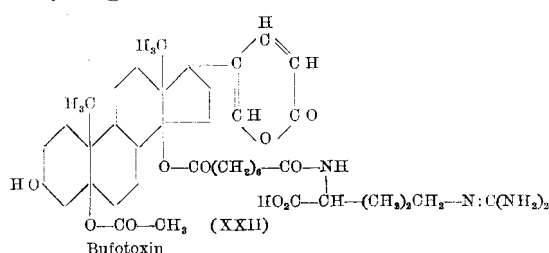
Eine von C<sub>9</sub> aus entstehende Doppelbindung kann sich zwischen 8—9 oder 9—11 legen; 8—9 kommt nach dem Gesagten nicht in Frage, aber auch eine Lage C<sub>9</sub>—C<sub>11</sub> ist nicht möglich. Von Wieland, Rath u. Bennd<sup>58)</sup> wurde vor kurzem gezeigt, daß die reaktionsträge, nicht hydrierbare Doppelbindung des Zymosterins an dieser Stelle liegt. Dagegen ist die Lage 5—6, die vom C-Atom 5 aus entsteht, der katalytischen Hydrierung zugänglich, und mit der bisher für Bufotalin benutzten Formel ist ein befriedigendes Strukturbild gegeben.

Allerdings muß noch auf einen Befund hingewiesen werden, der noch der Klärung bedarf. Im Keton des Bufotaliens, dem Bufotalienon (XX), sollte in Analogie zum Cholestenon (XXI) die Doppelbindung C<sub>5</sub>—C<sub>6</sub> in Konjugation zum Carbonyl nach C<sub>4</sub>—C<sub>5</sub> verschoben sein und das vierfach ungesättigte Keton sollte daher wie Cholestenon im Ultraviolett-Absorptionsspektrum ein Maximum bei etwa 235 mμ aufweisen.

Man findet aber nur das für den ungesättigten Lacton-Ring charakteristische bei 300 mμ. Nun kann man heute aber nicht mit Sicherheit sagen, ob dieses zweite Maximum neben dem sehr ausgeprägten bei 300 mμ überhaupt in Erscheinung treten müßte, wenn man Bufotalienon analog dem Cholestenon aufpaßt. Da das Bufotalienon auch durch längeres Behandeln mit Chlorwasserstoff in Äther nicht verändert wird<sup>57)</sup>, könnte es auch so sein, daß die stark ungesättigte Natur der restlichen Molekel einer solchen Verschiebung der Doppelbindung entgegenwirkt.

Im Sekret von Bufo vulgaris kommen neben dem Hauptgift Bufotalin noch zwei Nebengifte Bufotalinin und Bufotalidin<sup>43, 38)</sup> vor. Sie sind neben dem fraglichen Cinobufotalidin<sup>58)</sup> und einem noch nicht näher bekannten Genin aus dem Sekret von Bufo arenarum<sup>28)</sup> die einzigen Genine, die acetyl-frei sind und sechs Sauerstoff-Atome im Molekül tragen. Von den vier O-Atomen, die hiernach im Cholan-Gerüst stehen müssen, sind drei als alkoholische Hydroxyle nach Zerevitinoff nachzuweisen. Die Funktion des vierten Sauerstoff-Atoms ist noch nicht bekannt. Ebenso ist es bisher nicht geglückt, die nach der Summenformel im Bufotalinin zu erwartenden Doppelbindungen im Ringsystem scharf zu erfassen. Bufotalidin enthält nach dem Ergebnis der Alkali-Spaltung sicher eine tertiäre Hydroxyl-Gruppe an C<sub>14</sub>. Mehr läßt sich über diese beiden Genine bisher nicht aussagen.

Als vierten herzgliftigen Stoff haben Wieland u. Alles<sup>59)</sup> im Hautsekret der Erdkröte das Bufotoxin aufgefunden. Es ist, wie jetzt<sup>35)</sup> erkannt wurde, als Ester des Bufotalins mit der Säurekomponente Suberylarginin aufzufassen. Bei der Säurespaltung erhält man Bufotalien (IIa), neben Arginin und Korksäure. Wie die Genine enthält das Bufotoxin ebenfalls den doppelt ungesättigten δ-Lacton-Ring, wie sein UV.-Absorptionsspektrum zeigt. Die beiden Doppelbindungen des letzteren können bei der katalytischen Hydrierung mit geeigneten Katalysatoren erfaßt werden. Der Suberylarginin-Rest ist an das tertiäre Hydroxyl an C<sub>14</sub> des Cholan-Ringsystems zu verlegen, da das Toxin mit Chromsäure zu einem Monoketon oxydiert werden kann und für die dritte acetylierte Hydroxyl-Gruppe gleiche Stellung wie im Bufotalin angenommen werden darf. Leider gelang es bis jetzt nicht, zu entscheiden, ob das Suberylarginin durch ein Carboxyl der Korksäure an das Bufotalin gebunden ist, was am wahrscheinlichsten ist, oder ob Arginin als Brücke zwischen Genin und Korksäure fungiert. Immerhin konnte man bei der Einwirkung alkoholischer Barytlauge ein Barium-Salz isolieren, das zwei



<sup>56)</sup> Liebigs Ann. Chem. **548**, 21 [1941].

<sup>58)</sup> H. Kondo u. S. Ohno, J. pharmac. Soc. Japan **58**, 235 [1938].

<sup>59)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. **55**, 1789 [1922].

<sup>57)</sup> Nicht veröffentlicht.



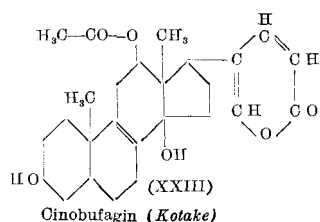
Äquivalente Barium und Methoxyl enthielt. Danach ist der Lacton-Ring auch hier in der früher erörterten Weise geöffnet worden und ein Barium-Enolat eines Methylesters entstanden. Das zweite Äquivalent Barium muß von dem freien Carboxyl des Suberylarginins gebunden worden sein. Dies ist nicht unwichtig, da sich diese Carboxyl-Gruppe bei der Titration des Bufotoxins, selbst in Alkohol, nur zu etwa 22% erfassen läßt, ein Zeichen dafür, daß die freie Carboxyl-Gruppe dem schwächer sauren Rest, dem Arginin, angehört. Aus diesen Gründen ergibt sich für Bufotoxin die Formel (XXII).

Anschließend hieran soll gleich das, was man über die anderen Kröten-Toxine weiß, besprochen werden. Das Gamabufotoxin aus *Bufo formosus*, das *Wieland* u. *Voche*<sup>42)</sup> zuerst isolierten, kann seiner Formel nach gleichfalls als Suberylargininester des Gamabufogenins aufgefaßt werden. Dies wird bestätigt durch die Feststellung *Kondos*<sup>60)</sup>, daß das aus ihm entstehende Spaltgenin (Anhydrogamabufogenin), wie das Gamabufogenin selbst, die für den ungesättigten Lacton-Ring charakteristische UV.-Absorptionsbande bei 300 m $\mu$  aufweist. Auch das Arneobufotoxin von *Wieland* u. Mitarb.<sup>35)</sup> zeigt dieselbe Bande. Welches Genin diesem Toxin zugrunde liegt, ist noch nicht sicher zu entscheiden. Mit Ausnahme des Marinobufotoxins von *Jensen* u. *Chen*<sup>61)</sup>, das mit Wahrscheinlichkeit ebenfalls ein Suberylargininester des Marinobufagins ist, lassen sich über die Genine der anderen isolierten Bufotoxine keine näheren Angaben machen.

Die Genine der anderen Krötenarten können weniger ausführlich besprochen werden, da einerseits schon bei Bufotalin auf die analogen Ergebnisse für die anderen Giftstoffe hingewiesen wurde, andererseits über einige näher untersuchte Giftstoffe bei den einzelnen Bearbeitern keineswegs immer Übereinstimmung besteht und somit die weitere Entwicklung erst abgewartet werden muß. Dies gilt besonders für das Pseudo-desacetylbufotalin aus *Senso* von *Kondo* u. Mitarb.<sup>62)</sup>.

Aus der wiederholt genannten chinesischen Droge *Senso* ist von *Shimizu*<sup>63)</sup>, *Kodama*<sup>25)</sup>, *Kotake*<sup>64)</sup> und *Tschesche* u. *Offe*<sup>47)</sup> eine Reihe herztgiftiger Prinzipien isoliert worden. Das Hauptgenin vom Schmp. 223° wurde Cinobufagin genannt. Wie *Kotake* u. *Kuwada*<sup>49)</sup> vor kurzem fanden, besteht dieses Cinobufagin aber aus einem Gemisch sehr nahe miteinander verwandter Genine, die Mischkristalle von dem angegebenen Schmelzpunkt bilden und durch chromatographische Adsorption voneinander getrennt werden können. Der Hauptbestandteil des früheren Cinobufagins behielt diesen Namen, das Nebengift bekam den Namen Cinobufotalin. Sie müssen nach dem Ergebnis der Selen-Dehydrierung und der UV.-Absorption des Gemisches der beiden Genine als Steroide mit doppelt ungesättigtem  $\delta$ -Lacton-Ring als Seitenkette betrachtet werden. Auf Grund der von *Kotake* kürzlich<sup>26)</sup> erhobenen Befunde können auch noch Angaben über die Anordnung der Hydroxyl- bzw. Acetoxyl-Gruppen im Cholan-Ring-system gemacht werden.

Cinobufagin enthält drei hydrierbare Doppelbindungen, wovon eine also im Ringgerüst untergebracht werden muß. Durch Chromsäure-Oxydation erhält man ein Monoketon, woraus auf eine sekundäre OH-Gruppe geschlossen werden muß, die *Kotake* aus den schon besprochenen Gründen an das C-Atom 3 verlegt. Aus dem Verlauf der schon früher



erörterten alkalischen Aufspaltung des Cinobufagins ergibt sich die Anwesenheit einer freien tertiären Hydroxyl-Gruppe an C<sub>14</sub>. Für die Stellung der acetylierten OH-Gruppe an C<sub>12</sub>, wie es Formel (XXIII) zeigt, haben *Kotake* u. *Kuwada*<sup>26)</sup> folgende Argumente beibringen können.

<sup>60)</sup> J. pharmac. Soc. Japan **59**, 186 [1939]. <sup>61)</sup> J. biol. Chemistry **87**, 755 [1930]. <sup>62)</sup> H. Kondo u. S. Ohno, J. pharmac. Soc. Japan **58**, 15 [1937]. <sup>63)</sup> J. Pharmacol. exp. Therapeut. **8**, 347 [1916]. <sup>64)</sup> Liebigs Ann. Chem. **465**, 1 [1928].

nach *Hammarsten*. Für den positiven Ausfall dieser Reaktion ist an einer Reihe von Beispielen gezeigt worden, daß hierzu zwei sekundäre Hydroxyle an C<sub>3</sub> und C<sub>12</sub> und eine Doppelbindung zwischen C<sub>7</sub>—C<sub>8</sub> oder C<sub>8</sub>—C<sub>9</sub> oder eine OH-Gruppe an C<sub>7</sub> des Cholan-Ringsystems notwendig sind. Da Cinobufagin kein Brom addiert und mit Benzopersäure kein Oxyd gibt, glaubt *Kotake*, daß die Doppelbindung im Cinobufagin nach C<sub>8</sub>—C<sub>9</sub> zu verlegen ist. Da aber Cinobufagin und sein Anhydro-Derivat leicht hydriert werden, muß man nach den oben angeführten Erfahrungen an den Cholestenolen annehmen, daß diese Doppelbindung durch den Katalysator vor der Hydrierung mindestens nach C<sub>6</sub>—C<sub>7</sub> hin verschoben wird.

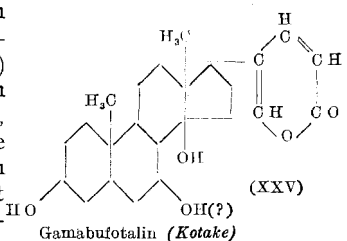
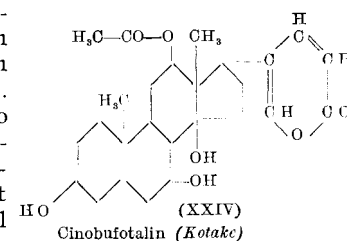
Dem Cinobufotalin kommt eine um 1 Mol Wasser reichere Formel als Cinobufagin zu. Es liefert mit Chromsäure ein Diketon und besitzt nur zwei Doppelbindungen, eben die im Lacton-Ring. Es soll, da es auch die Reaktion nach *Hammarsten* zeigt, das zweite sekundäre Hydroxyl an C<sub>7</sub> tragen und im übrigen wie Cinobufagin gebaut sein (Formel XXIV).

Über die anderen aus *Senso* isolierten Genine Bufalin, Cinobufotalidin und Pseudo-desacetylbufotalin liegt umfangreiches Versuchsmaterial der früher genannten Autoren vor. Es ist aber schwierig, nach den sich in manchen Punkten widersprechenden experimentellen Angaben und der Verwirrung, die in der Deutung der Versuche herrscht, ein klares Bild zu geben, und es muß hier daher auf eine Erörterung verzichtet werden.

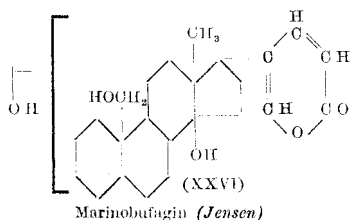
Aus dem Hautsekret der japanischen Kröte *Bufo formosus* wurden verschieden benannte Genine isoliert, die sich aber als miteinander identisch erwiesen haben: Gamabufotalin von *Kotake*<sup>65)</sup>, Gamabufogenin von *Wieland* u. *Voche*<sup>42)</sup> und Gamabufagin von *Chen*, *Jensen* u. *Chen*<sup>66)</sup>.

*Kotake* u. *Kubota*<sup>62)</sup> haben vor kurzem für das Gamabufotalin die Strukturformel (XXV) vorgeschlagen. Dieses Genin zeigt, wie oben schon erwähnt, die gleiche UV.-Absorption wie die bisher besprochenen; auch die Alkali-Spaltung verläuft gleichartig, womit der Lacton-Ring und eine tertiäre OH-Gruppe an C<sub>14</sub> sichergestellt sind. Die beiden anderen Hydroxyle sind leicht acetylierbar. Mit konz. Salzsäure läßt sich aber nur eine der drei OH-Gruppen unter Aufrichtung einer Doppelbindung als Wasser abspalten. Das so entstehende Anhydrogamabufotalin lagert jedoch katalytisch nur 2 Mol Wasserstoff an, enthält also eine schwer hydrierbare Doppelbindung im Cholan-Gerüst. *Kondo* u. *Ohno*<sup>60)</sup> konnten aber im Anhydrogamabufotalin keine solche schwer hydrierbare Doppelbindung finden. Da überdies Hydroxyl von C<sub>7</sub> ebenfalls leicht als Wasser abgespalten wird, muß man die Stellung der zweiten sekundären OH-Gruppe im Gamabufotalin noch offen lassen.

Zum Schluß soll noch ein Genin Erwähnung finden, das sich vielleicht in einem Punkt von den bisher besprochenen nicht unwesentlich unterscheidet, wenn sich die Befunde von *Jensen*<sup>27)</sup> bestätigen lassen. Das Marinobufagin aus der süd-amerikanischen Kröte *Bufo marinus* soll danach an Stelle der Methyl-Gruppe an C<sub>10</sub> oder C<sub>13</sub> des Gallensäure-Skeletts eine anguläre Oxymethyl-Gruppe tragen. Es wäre dann mit dem pflanzlichen Herzgift Ouabain zu vergleichen, für welches eine solche anguläre Oxymethyl-Gruppe an C<sub>10</sub> von *Fieser*<sup>67)</sup> und *Tschesche*<sup>68)</sup> als gesichert angenommen wird. Für Marinobufagin ist, wie schon früher angegeben wurde, ebenfalls ein doppelt ungesättigter Lacton-Ring als Seitenkette am Steran-Gerüst bewiesen worden. Von den drei vorhandenen alkoholischen Hydroxyl-Gruppen ist eine tertiär, *Jensen* verlegt sie, wegen des Verlaufs der Alkali-Spaltung, die hier allerdings nur zu einer amorphen „Anhydrobufaginsäure“ führte, nach C<sub>14</sub>. Die beiden anderen sind leicht acetylierbar<sup>28)</sup> und können daher entweder sekundär oder primär sein. Mit alkoholisch-wäßriger Schwefelsäure werden zwei der drei OH-Gruppen unter Aufrichtung je einer Doppelbindung als Wasser ab-



gespalten; eine davon wird das tertiäre Hydroxyl an C<sub>14</sub> sein. Die Stellung der zweiten leicht acetylierbaren OH-Gruppe läßt Jensen noch offen. Das dritte Hydroxyl soll sich nun in einer Oxymethyl-Gruppe an C<sub>10</sub> oder C<sub>13</sub> finden, denn mit 50%iger Schwefelsäure bei 70° liefert Marinobufagin Formaldehyd. Es zeigt damit ein ähnliches Verhalten wie das schon genannte Ouabain. Schließlich gibt Jensen an, daß es ihm gelungen ist, im



Chromsäure-Oxydationsprodukt des Marinobufagins eine Aldehyd-Gruppe nachzuweisen. Da Tschesche u. Offe<sup>69)</sup> in diesem Genin noch drei Doppelbindungen durch katalytische Hydrierung gefunden haben, schreibt Jensen dem Marinobufagin Formel (XXVI) zu.

Für die anderen in Tab. I aufgeführten Kröten-Genine ist die chemische Untersuchung kaum oder meist überhaupt nicht über die Aufstellung der Bruttoformel hinausgekommen, oder sie sind nur pharmakologisch geprüft worden. Bei den beiden Geninen der süd-amerikanischen Krötenart *Bufo arenarum* müssen die gegenseitigen Beziehungen erst noch aufgeklärt werden, so daß es sich im Rahmen dieser Zusammenfassung erübrigt, näher darauf einzugehen.

Eingeg. 2. Juli 1942. [A. 39]. (Schluß folgt.)

<sup>69)</sup> Ebenda 69, 2361 [1936].

## Analytisch-technische Untersuchungen

### Zur colorimetrischen Bestimmung des Sauerstoffs in strömenden Gasen

Von Dr.-Ing. HEINRICH MACURA und Dipl.-Chem. GÜNTHER WERNER

Mitt. aus dem Schlesischen Kohlenforschungsinstitut der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft, Breslau

Zu diesem Zweck benutzen Hofer u. v. Wartenberg<sup>1)</sup> eine alkalische Natriumhydrosulfit-Lösung, der eine bestimmte Menge Indigocarmin (5,5'-Indigo-disulfonsäure) zugesetzt ist<sup>2)</sup>. Der Farbstoff wird in dieser Lösung verküpt; der durchperlende O<sub>2</sub>-haltige Gasstrom oxydiert die Leukoverbindung wieder zum Farbstoff, wobei die Farbe von Gelb in Blaugrün übergeht, die durch zwei empirische Vergleichsfarben — Guineaeachtgelb und Columbiagrün<sup>3)</sup> — festgelegt sind. Der Verlauf der Farbvertiefung zwischen den beiden Eichtönen wird beobachtet und die dazu erforderliche Gasmenge mit dem Gasmesser bestimmt.

Dieses Verfahren, das für die Betriebskontrolle gedacht war, wurde von uns zu einer Präzisionsbestimmung ausgebaut und in einigen wesentlichen Punkten abgeändert. Die Farbänderung der verküpten Indigocarmin-Lösung hängt stark vom Alkali-Zusatz ab. In bicarbonatalkalischer Lösung geht die Farbänderung von Gelb zu Blau, ohne rote Nuancen zu durchlaufen. In stark alkalischer Lösung bildet sich das Na-Salz der 5,5'-Indigo-disulfonsäure, das eine unrein gelbe Färbung gibt und nicht verküpbare ist.

In 0,15 n-Natronlauge gibt Indigocarmin eine blaugrüne Lösung, deren Farbe beim Verküpen rein gelb wird und bei der Oxydation die Farbtöne Orange, Rot, Violett durchläuft und bei Blaugrün endet. Diese Farbskala gestattet einen sehr genauen Farbvergleich, weil sie viel differenzierter ist als der Farbumschlag von Gelb zu Blau. Deshalb legten wir sie unserem Verfahren zugrunde.

Die eingangs genannten Vergleichsfarben sind für diese Farbskala unbrauchbar, weil sie deren Enden zu nahe liegen. Unsere Vergleichsfarben — Naphtholorange und Indigocarmin — liegen weiter nach der Mitte der Skala, wodurch die Farbentwicklung der Reaktionslösung Vorlauf und Auslauf erhält. Erst dadurch wird ein genauer Farbvergleich möglich. Da ferner die Ablesegenauigkeit eines Gasmessers in keinem Verhältnis zur Schärfe steht, mit der die Farbgleichheit in Reaktions- und Vergleichslösung zu erfassen ist, arbeiten wir mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit (0,5 l/min) und bestimmen die Dauer der Farbänderung mit der Stoppuhr auf volle Sekunden. Der O<sub>2</sub>-Wert wird einem Konzentration-Zeit-Diagramm entnommen.

Die Apparatur (Abb. 1) ist grundsätzlich die gleiche geblieben; sie steht in einem Kasten, in den lediglich durch eine Milchglasscheibe das Licht einer Soffittenlampe (40—60 Watt) fällt. Die beiden Flaschen sollen möglichst den gleichen Durchmesser haben wie das Absorptionsgefäß. Dieses wird mit 300 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser, 5 cm<sup>3</sup> kalt ges. Indigocarmin-Lösung und 1 cm<sup>3</sup> 4n-NaOH gefüllt, der Tropftrichter bis zum Ende des Auslaufs mit 10%iger Natriumhydrosulfit-Lösung. Damit während der Messung kein Hydrosulfit nachtropft, wird an einem Draht ein Stückchen Filterpapier befestigt und unter den Tropftrichter gebracht. Hierauf wird der Gasstrom auf 0,5 l/min eingestellt und durch einen Strömungsmesser am Gasaustrittsrohr kontrolliert; gegen Schwan-

kungen ist das Verfahren wenig empfindlich. Als Gaseinleitungsrohr dient eine Jenaer Fritte G 1. Das Absorptions-

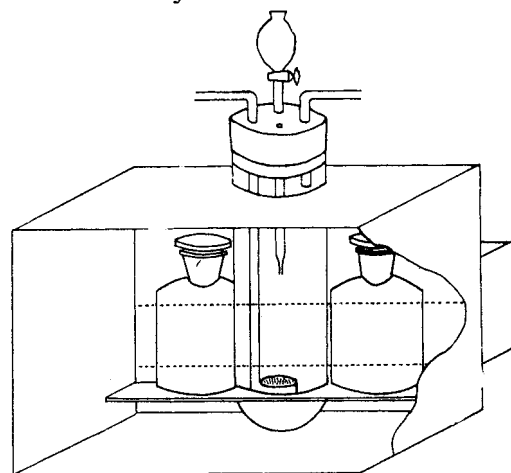


Abb. 1. Der besseren Übersicht wegen ist der Tropfenfänger weggelassen und nur die für ihn bestimmte Bohrung im Stopfen angedeutet. Die punktierten Linien bezeichnen die Lage des Beleuchtungsschlitzes.

rohr wird dann 1 min mit dem Gasstrom gespült, Hydrosulfit zugegeben, bis eben reine Gelbfärbung auftritt, und die Zeit bestimmt, in der sich die Farbe von Orange bis zum blauen Eichtön entwickelt.

Tabelle 1.			Streuung der Analysenwerte für Meßfehler = ± 2 s	
% O <sub>2</sub>	t s	Δt		
1,0	67	9	0,07	
0,9	76	12	0,06	
0,8	88	18	0,08	
0,7	106	23	0,03	
0,6	129	30	0,02	
0,5	150	33	0,02	
0,4	192	48	0,02	
0,3	240	80	0,01	
0,2	320	180	0,01	
0,1	500		0,005	

Tab. 1 enthält die Daten, die unserer Eichkurve (Abb. 2) zugrunde liegen.

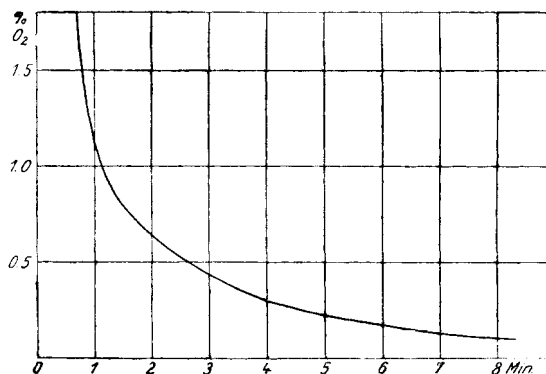


Abb. 2. Eichkurve: Diagramm aus O<sub>2</sub>-Konzentration in Vol.-% und Zeit in Sekunden.

<sup>1)</sup> a) Diese Ztschr. 38, 9 [1925]. b) Dieselben, Diss. T. H. Danzig 1923; c) Sachlich unveränderte Auszüge in: F. Bayer: Gasanalyse, Encke Stuttgart. I. u. II. Aufl. 1938 u. 1941.

<sup>2)</sup> Franzen, Ber. dtsh. chem. Ges. 39, 2069 [1906].

<sup>3)</sup> Der I. G. Farbenindustrie A.-G., Ludwigshafen a. Rh., sind wir für die Überlassung dieser Farbstoffe zu Dank verpflichtet.