

256. H. Jensen und K. K. Chen: Chemische Studien über Kröten-Gifte, V. Mitteil.: Die basischen Bestandteile des Kröten-Sekrets.

[Aus d. Dept. of Pharm., Johns Hopkins Univ., Baltimore, und d. Lilly Research Labor., Eli Lilly & Co., Indianapolis.]

(Eingegangen am 6. Juli 1932.)

Im Verlauf unserer Studien über Kröten-Gifte haben wir die Sekrete verschiedener Arten von Kröten untersucht. Die wichtigeren, aus diesen Sekreten isolierten wirksamen Prinzipien können in drei Gruppen eingeteilt werden: 1. Bufagine, 2. Bufotoxine und 3. basische Bestandteile, a) Epinephrin und b) Bufotenine. Die Bufagine sind ungesättigte neutrale Verbindungen mit einem Lacton-Ring und einer verschiedenen Anzahl von Hydroxylgruppen, von denen eine mit einer Fettsäure, z. B. Ameisensäure oder Essigsäure¹⁾, verknüpft ist. Sie besitzen die wesentlichen physiologischen Eigenschaften der Glieder der Digitalisgruppe²⁾. Dazu kommt, daß eine chemische Verwandtschaft zwischen einigen Bufaginen und den auf das Herz wirkenden Agluconen der Pflanzen-Glucoside zu bestehen scheint³⁾. Wieland und seine Mitarbeiter indessen haben die Ansicht ausgesprochen, daß Bufotalin (das Bufagin von *Bufo vulgaris*) chemisch den Gallensäuren verwandt ist⁴⁾. Die Bufotoxine sind Verbindungen von Suberyl-arginin mit dem entsprechenden Bufagin⁴⁾. Dieser nahen chemischen Verwandtschaft gemäß ist die physiologische Wirkung der Bufotoxine ähnlich der der Bufagine⁵⁾. Epinephrin ist aus dem Sekret von *Bufo marinus*⁶⁾ und aus Ch'an Su⁷⁾ isoliert und auch in den Sekreten anderer Kröten^{2b)} nachgewiesen worden. Neben diesen wirksamen Stoffen enthalten die Sekrete der verschiedenen Kröten-Arten basische Substanzen, denen wir den Gattungsnamen Bufotenine gegeben haben. Diese Verbindungen sind Gegenstand des vorliegenden Berichtes.

1893 erhielten Phisalix und Bertrand aus dem Sekret von *Bufo vulgaris*⁸⁾ eine amorphe Base, die sie Bufotenin nannten. Mehrere Jahre später gelang es Handovsky, diese Base aus dem Sekret derselben Kröte kristallin zu erhalten; er sprach ihr die empirische Formel C_6H_9ON zu und untersuchte ihre pharmakologischen Eigenschaften⁹⁾.

Bei der chemischen Untersuchung von Ch'an Su, dem getrockneten Gift der chinesischen Kröte, erhielten wir neben Epinephrin eine Base mit ausgesprochener Wirkung auf den Blutdruck, der wir den Namen Cinobufotenin^{2a)}, ^{4b)} beileigten. Die Untersuchung der Sekrete verschiedener anderer Kröten-Arten hat die Gegenwart ähnlicher basischer Bestandteile ergeben. Diese Bufotenine sind organische Basen, die wasser-unlösliche Salze mit Flavian- und

¹⁾ H. Jensen, *Science* **75**, 53 [1932].

²⁾ a) K. K. Chen, H. Jensen u. A. L. Chen, *Journ. Pharmacol. exp. Therap.* **43**, 13 [1931]; b) *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.* **29**, 905 [1932]; *Amer. Journ. Physiol.* **101**, 20 [1932]. ³⁾ H. Wieland, G. Hesse u. H. Meyer, *A.* **403**, 272 [1932].

⁴⁾ a) H. Wieland u. R. Alles, *B.* **55**, 1789 [1922]; b) H. Jensen u. K. K. Chen, *Journ. biol. Chem.* **87**, 741 [1930]; c) H. Wieland u. F. Vocke, *A.* **481**, 215 [1930].

⁵⁾ K. K. Chen, H. Jensen u. A. L. Chen, *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.* **29**, 907 [1932].

⁶⁾ J. J. Abel u. D. I. Macht, *Journ. Pharmacol. exp. Therap.* **3**, 319 [1911–12].

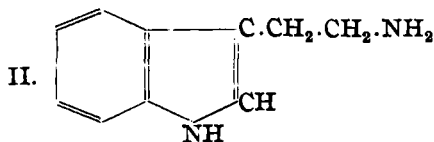
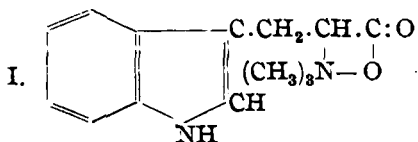
⁷⁾ H. Jensen u. K. K. Chen, *Journ. biol. Chem.* **82**, 397 [1929].

⁸⁾ C. Phisalix u. G. Bertrand, *Compt. rend. Soc. Biol.* **45**, 477 [1893], **54**, 932 [1902]. ⁹⁾ H. Handovsky, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **86**, 138 [1920].

Pikrinsäure ergeben. Sie sind meistens als Flavianate isoliert worden. Die Untersuchung ihres pharmakologischen Verhaltens zeigte, daß mehrere dieser Bestandteile ausgesprochene Wirkung auf den Blutdruck besitzen¹⁰⁾.

Während unsere chemischen und pharmakologischen Untersuchungen dieser Stoffe im Gange waren, beschrieben Wieland, Hesse und Mittasch¹¹⁾ die Isolierung von Bufotenin (aus *Bufo vulgaris*) und „Bufotenidin“, dem Bufotenin des Sekrets der chinesischen Kröte. Diese Forscher glauben, daß die genannten Verbindungen in enger Beziehung zum Hypaphorin, dem Betain des Tryptophans (I), stehen. Da wir indessen festgestellt haben, daß diese beiden Bufotenine ausgesprochene Wirkung auf den Blutdruck besitzen, schien es zweifelhaft, daß Verbindungen solcher chemischen Struktur Blutdruck erhöhende Eigenschaften haben sollten. Dieser Zweifel wurde durch die Beobachtung verstärkt, daß Hypaphorin keine Wirkung auf den Blutdruck ausübt. Dieser Befund macht Wielands als möglich angenommene Struktur für Bufotenin und „Bufotenidin“ ziemlich unwahrscheinlich. Die von Wieland und Mitarbeitern¹¹⁾ ausgesprochene Ansicht, daß das von uns aus Ch'an Su (Senso)¹²⁾ erhaltene Bufotenin identisch mit dem von ihnen aus *Bufo vulgaris* gewonnenen sei, trifft nicht zu: Der Schmp. des Bufotenin-Flavianates aus Ch'an Su ist 200.5°, der des Pikrats¹²⁾ 197°. Diese Schmp., sowie die analytischen Daten (s. Tabelle I) stimmen genau überein mit denen der entsprechenden Salze des Bufotenins aus *Bufo bufo gargarizans* (chinesische Kröte).

Zurzeit wissen wir noch wenig von der chemischen Konstitution dieser Basen. Die ersten 6 Bufotenine in Tabelle I verhalten sich positiv bei den für Indol-Derivate als spezifisch angenommenen Farbenreaktionen. Man kann daher die Gegenwart des Indol-Ringes in diesen Verbindungen annehmen. Bei der Behandlung des Flavianats des Bufotenins aus Ch'an Su mit Alkali spaltet dieses Trimethylamin ab, was mit der Beobachtung von Wieland und Mitarbeitern¹¹⁾ übereinstimmt. Wir neigen zu der Annahme, daß diese Bufotenine Derivate des β -[Indolyl-3]-äthylamins (II) sind. Die pharmakologische Untersuchung einer Anzahl von Tryptamin-Derivaten hat gezeigt, daß sie in der physiologischen Wirkung diesen Bufoteninen ähnlich sind. Trotz dieser großen pharmakologischen Ähnlichkeit halten wir es indessen für ratsam, uns weiterer Spekulationen über die chemische Konstitution dieser Stoffe zu enthalten, bis sich eine genauere chemische Aufklärung ergeben hat.



Der größte Teil der in dieser Arbeit angegebenen Analysen wurde von Dr.-Ing. A. Schöller, Berlin-Schmargendorf, ausgeführt. Die analytischen Daten in Tabelle I stellen Durchschnittswerte dar, die aus einer Anzahl von Analysen berechnet wurden.

¹⁰⁾ K. K. Chen, H. Jensen u. A. L. Chen, *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.* **29**, 908 [1932]. ¹¹⁾ H. Wieland, G. Hesse u. H. Mittasch, *B.* **64**, 2099 [1931].

¹²⁾ Wir sind Dr. A. Ling Chen für die Herstellung von Cinobufotenin-Pikrat zu Dank verpflichtet.

Bufotenin-Flavianate aus	Schmp.	Elementar- Zusammensetzung
Ch'an Su	200.5 ⁰	C ₁₃ H ₂₀ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo bufo gargarizans.....	190 ⁰	C ₁₅ H ₂₀ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo fowleri	198—199 ⁰	C ₁₃ H ₂₀ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo formosus.....	186—187 ⁰	C ₁₂ H ₁₈ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo bufo bufo.....	180—181 ⁰	C ₁₂ H ₁₈ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo viridis viridis	170 ⁰	C ₁₂ H ₁₈ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo valliceps	261—262 ⁰	C ₁₁ H ₁₆ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo marinus	271—272 ⁰	C ₁₅ H ₁₈ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo alvarius	224—225 ⁰	C ₁₂ H ₁₈ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo arenarum	130—131 ⁰	C ₁₅ H ₂₀ O ₃ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S
Bufo viridis viridis	130—131 ⁰	C ₁₂ H ₂₀ O ₃ N ₂ , C ₁₀ H ₆ O ₈ N ₂ S

Beschreibung der Versuche.

Isolierung der Bufotenine als Flavianate.

Das Sekret, das durch Ausdrücken der Ohrdrüse der Kröte erhalten wird, wird gesammelt, bei Zimmer-Temperatur getrocknet, pulverisiert und dann 8 Tage lang mit 95-proz. Alkohol bei Zimmer-Temperatur extrahiert (150 ccm 95-proz. Alkohol auf 10 g Trockensekret). Das Extrahieren wird nochmals wiederholt. Die beiden vereinigten Extrakte werden im Vakuum fast zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird dann mit Wasser (75 ccm Wasser auf je 10 g des ursprünglichen Trockensekrets) aufgenommen, filtriert, oder besser zentrifugiert, und wieder auf dieselbe Weise mit Wasser extrahiert. Die wäßrigen Extrakte werden vereinigt und mehrmals mit Amylalkohol ausgeschüttelt, um die Bufotoxine und Bufagine zu entfernen. Die wäßrige Schicht des Amylalkohol-Extraktes wird wiederholt mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Abtrennen und Filtrieren wird Flaviansäure im Überschuß zu der wäßrigen Schicht hinzugefügt und die Lösung über Nacht in den Eisschrank gestellt. Der Niederschlag, der das Bufotenin-Flavianat darstellt (Epinephrin wird durch Flaviansäure nicht gefällt), wird entweder aus Wasser oder 50-proz. Alkohol bis zum konstanten Schmp. umgelöst. Es sind gewöhnlich mehrere Krystallisationen nötig.

Einwirkung von Alkali auf Cinobufotenin: Das Flavianat des Cinobufotenins wird auf dem siedenden Wasserbade mit 10-proz. KOH behandelt und das Amin durch einen Stickstoff-Strom übergetrieben, in 2-n. Salzsäure aufgefangen und als Goldsalz identifiziert.

11.049 mg Sbst.: 5.400 mg Au. — 15.083 mg Sbst.: 7.400 mg Au.

N(CH₃)₃, AuCl₄H. Ber. Au 49.4. Gef. Au 48.9, 49.1.

Diskussion.

Auf Grund gleicher analytischer Daten, pharmakologischer, chemischer und physikalischer Eigenschaften bilden die Bufotenine aus Ch'an Su, Bufo bufo gargarizans (chinesische Kröte) und Bufo Fowleri eine Gruppe offenbar identischer Verbindungen. Auf Grund derselben Kriterien können die Bufotenine aus Bufo formosus, Bufo bufo bufo (Bufo vulgaris)

belle I.

Analysen								Wirkung auf d. Blutdruck
gef. %				ber. %				
C	H	N	S	C	H	N	S	
50.60	4.70	9.88	5.8	50.18	4.73	10.18	5.82	+++
50.35	4.76	.75	5.97	50.18	4.73	10.18	5.82	+++
50.28	4.85	9.90	6.00	50.18	4.73	10.18	5.82	+++
49.65	4.78	9.55	5.94	49.25	4.48	10.45	5.97	++
48.89	4.84	9.70	5.89	49.25	4.48	10.45	5.97	+
49.03	4.82	9.70	—	49.25	4.48	10.45	5.97	+
49.03	3.85	11.14	6.57	48.65	3.48	10.81	6.18	—
51.09	4.06	10.40	6.19	49.62	3.76	10.52	6.01	—
49.30	4.94	9.62	5.81	49.25	4.48	10.50	5.97	—
47.70	4.71	10.36	5.74	47.65	4.69	10.10	5.78	—
47.54	4.76	9.61	5.86	47.65	4.69	10.10	5.78	—

und *Bufo viridis viridis* als eine zweite Gruppe von offenbar ähnlichen Grundstoffen klassifiziert werden. Chemisch scheint eine enge Verwandtschaft zwischen diesen beiden Gruppen von Verbindungen zu bestehen; strukturell unterscheidet sich die erste Gruppe von der zweiten dadurch, daß sie eine Methylgruppe mehr hat. Wieland und seine Mitarbeiter¹¹⁾ konnten das Bufotenin aus *Bufo bufo bufo* (*Bufo vulgaris*) durch Methylieren in das Bufotenin aus *Ch'an Su* überführen.

Die Bufotenine der zweiten Gruppe haben weniger den Blutdruck erhöhende Eigenschaften als die der ersten Gruppe. Der niedrigere Schmp. des Bufotenin-Flavianats aus *Bufo viridis viridis* im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Gruppe kann der Tatsache zugeschrieben werden, daß die geringe Menge zur Verfügung stehenden Materials eine weitere Reinigung des Salzes unmöglich machte. Beim Aufarbeiten einer neuen Portion Trockensekret derselben Art erhielten wir nur ein Flavianat, das schon bei 130° schmolz und dem jegliche Wirkung auf den Blutdruck fehlte. Die aus den Sekreten der verschiedenen anderen Arten von Kröten erhaltenen Bufotenine zeigen keine Wirkung auf den Blutdruck (s. Tabelle I). Das Bufotenin aus *Bufo valliceps* scheint mit Tryptophan identisch zu sein. Tryptophan-Flavianat schmilzt bei 264–265° unt. Zers. Der Misch-Schmp. von Tryptophan-Flavianat und dem Bufotenin-Flavianat zeigt keine Depression, außerdem stimmen die analytischen Daten des Kröten-Stoffes sehr gut mit den für Tryptophan berechneten überein. Das Bufotenin aus *Bufo marinus* scheint Methyl-tryptophan zu sein und das aus *Bufo alvarius* Tetrahydro-methyl-tryptophan. Die Bufotenine aus *Bufo arenarum* und aus *Bufo viridis viridis* (Schmp. 130–131°) scheinen identisch zu sein. Die mögliche Verwandtschaft der Bufotenine mit β -[Indolyl-3]-äthylamin wird unter Vorbehalt angenommen. Überdies dürfte vielleicht später eine Revision der hier für die verschiedenen Stoffe gegebenen empirischen Formeln nötig sein.

Der eine von uns (H. Jensen) ist der Firma Eli Lilly & Co. für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Ferner möchten

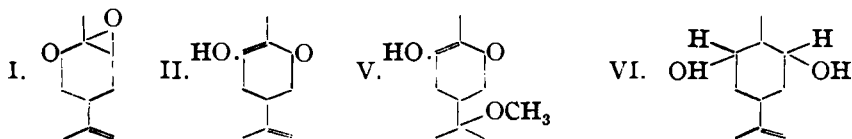
wir Hrn. Dr. R. Jackson von der Yale Universität unsern Dank für die Übersendung von Hypaphorin und Tryptophan aussprechen, sowie Hrn. Dr. R. Manske, Ottawa, Canada für die Überlassung einer Anzahl von β -[Indolyl-3]-äthylamin-Derivaten.

257. W. Treibs: Zur Autoxydation α,β -ungesättigter Ketone, V. Mitteil.: Reaktionsverlauf und Reaktionsprodukte der Autoxydation des Carvons.

(Eingegangen am 14. Juli 1932.)

Auf Grund der Arbeiten von Weitz¹⁾ über die Verwandlung von α,β -ungesättigten Ketonen in α -Oxyde durch Einwirkung von H_2O_2 in alkalisch-alkohol. Lösung und von Jörlander²⁾ über die Umlagerung dieser Oxyde in Diketone durch heiße alkohol. Alkalilauge war angenommen worden³⁾, daß bei der Autoxydation der α,β -ungesättigten Ketone primär stets die Keto-oxydo-verbindungen gebildet würden, und daß die endgültigen Reaktionsprodukte hieraus durch den umlagernden und hydrolysierenden Einfluß des alkalischen Mediums entstünden. Diese Annahme konnte am Carvon experimentell bewiesen werden. In einer früheren Mitteilung⁴⁾ war gezeigt worden, daß dieses Keton in alkalisch-alkohol. Lösung unter der Einwirkung von Hydroperoxyd oder von molekularem Sauerstoff in drei Verbindungen $C_{10}H_{14}O_2$, $C_{11}H_{18}O_3$ und $C_{20}H_{28}O_3$ übergeführt wird. Es gelang, diese Oxydationsprodukte auch aus der Keto-oxydo-verbindung des Carvons zu erhalten und ihren chemischen Bau durch Ermittlung der Bedingungen ihres Zustandekommens und durch alkalische Umlagerung und Hydrolyse aufzuklären.

Das Carvon-oxyd, $C_{10}H_{14}O_2$ (I), wurde durch Einwirkung von 30-proz. H_2O_2 auf die stark gekühlte Lösung von Carvon in Methanol in Gegenwart von wenig Alkali gewonnen. Es war eine farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit von ähnlichem, aber milderem Geruch als der Ausgangskörper. Unter



dem Einfluß von alkohol. Alkali in der Wärme wurde es nach 2 Richtungen hin abgewandelt: Teilweise lagerte es sich in das isomere alkali-lösliche Diketone oder Dihydro-resorcin $C_{10}H_{14}O_2$ um. Da dieses sich überwiegend wie ein Körper der Keto-enol-Formel II verhält, wird es im folgenden als Oxy-carvon bezeichnet. Teilweise lagerte das Carvon-oxyd Methanol an und ging in einen alkali-unlöslichen, flüssigen Körper $C_{11}H_{18}O_3$ (III) über. Bei Ausschluß von Wasser herrschte die Entstehung von III vor, bei Wasser-Gegenwart dagegen die Bildung des Oxy-carvons. Die krystallisierte Verbindung $C_{20}H_{28}O_3$ konnte aus Carvon-oxyd allein nicht dargestellt werden.

¹⁾ A. 330, 216 [1904]; B. 21, 1810 [1898].

²⁾ B. 64, 2179, 2548 [1931], 65, 165 [1932].

³⁾ B. 50, 406, 1458 [1917].

⁴⁾ B. 64, 2178 [1931].