

99. Die Giftstoffe der europäischen Erdkröte *Bufo bufo bufo* L.¹⁾²⁾.

Über Krötengifte, 8. Mitt.³⁾

von H. R. Urscheler, Ch. Tamm und T. Reichstein.

(7. IV. 55.)

Krötengifte werden vor allem in China seit langer Zeit medizinisch (als Herzmittel) verwendet und geschätzt. Besonders reich ist das Sekret der Parotisdrüsen; daneben soll es aber auch in der ganzen Haut verteilt vorkommen. Mit der Pharmakologie der Bufogenine und Bufotoxine haben sich unter andern *Faust*⁴⁾, *Gessner*⁵⁾, *Chen & Chen*⁶⁾ sowie *Raymond-Hamet*⁷⁾ befasst, mit der Pharmakologie der Krötenbasen vor allem *Handovsky*⁸⁾ und *Raymond-Hamet*⁹⁾. Aus der Erdkröte *Bufo bufo bufo* Linné = *Bufo vulgaris Laurenti* hat *Faust*⁴⁾ zuerst einen herzaktiven Stoff in amorpher Form stark angereichert und nannte ihn Bufotalin. *Wieland & Weil*^{h)} gelang es, den Giftstoff in reiner krist. Form zu erhalten, wobei sie den Namen Bufotalin beibehielten. *Wieland* und Mitarb. konnten später in kleinen Mengen noch drei weitere Gifte, das Bufotoxin¹⁰⁾ a) b), das Bufotalidin¹¹⁾ und das Bufotalinin^{a)} isolieren. Daneben enthält das Sekret noch die Basen¹²⁾ Bufotenin¹³⁾¹⁴⁾, Bufotenidin¹³⁾¹⁴⁾ sowie die

¹⁾ Auszug aus der Diss. H. R. Urscheler, Basel, die demnächst erscheint.

²⁾ Die mit Buchstaben bezeichneten Fussnoten siehe Seite 891.

³⁾ Im Einverständnis mit Herrn Prof. K. Meyer wird diese Arbeit in die von ihm begonnene Serie eingereiht. 7. Mitteilung, K. Meyer, Helv. **35**, 2444 (1952).

⁴⁾ E. St. Faust, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **47**, 279 (1902); **49**, 1 (1902).

⁵⁾ O. Gessner, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **113**, 343 (1926); Ber. Gesellschaft Beförd. Naturw. Marburg **61**, 138 (1926).

⁶⁾ K. K. Chen, H. Jensen & A. L. Chen, J. Pharmacol. exp. Therap. **47**, 307 (1933); K. K. Chen & A. L. Chen, ibid. **49**, 1, 14, 26, 503, 548, 561 (1933).

⁷⁾ Raymond-Hamet, C. r. Soc. biol. **137**, 178 (1943); C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. **217**, 459 (1943).

⁸⁾ H. Handovsky, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **86**, 138 (1920).

⁹⁾ Raymond-Hamet, C. r. Soc. biol. **135**, 1414 (1941); **136**, 318 (1942); **137**, 111 (1943); **147**, 301 (1953); **148**, 1613 (1954); C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. **214**, 506, 687 (1942); **218**, 54, 732 (1944); **222**, 691 (1946); **239**, 1881 (1954); Bull. Soc. chim. biol. **24**, 190 (1942).

¹⁰⁾ H. Wieland & R. Alles, Ber. deutsch. chem. Ges. **55**, 1789 (1922).

¹¹⁾ Bufotalidin wurde erstmals von J. Weil, Diss. München 1913, aus dem Sekret von *Bufo vulgaris* isoliert. Er bezeichnete es zuerst als Bufotalein. *Wieland & Hesse*^{g)} nannten es in Bufotalidin um.

¹²⁾ Zur Konstitution der Krötenbasen siehe auch L. F. Fieser & M. Fieser, „Natural Products Related to Phenanthrene“, 3rd Edition 1949, Seite 562 und ff.

¹³⁾ H. Wieland, G. Hesse & H. Mittasch, Ber. deutsch. chem. Ges. **64**, 2099 (1931).

¹⁴⁾ H. Wieland, W. Konz & H. Mittasch, Liebigs Ann. Chem. **513**, 1 (1934).

Sterine γ -Sitosterin¹⁾ und Ergosterin²⁾; das Hautgift enthält auch noch Cholesterin²⁾. *Chen* und Mitarb.²⁾ vermuteten, dass *Wieland* und Mitarb. nicht die Erdkröte *Bufo bufo bufo L.*, sondern die Wechselkröte *Bufo viridis viridis Laur.* untersucht haben. *Wieland* und seine Schüler haben insbesondere Bufotalin³⁾a)h)p) und Bufotoxin⁴⁾a)p) eingehend chemisch untersucht. Die definitive Konstitution dieser zwei Stoffe ist von *K. Meyer*¹⁾ bewiesen worden; es kommen ihnen die Formeln VII und XI zu.

Von Herrn Dr. *Raymond-Hamet*, Paris, der sich, wie erwähnt, selbst mit der Pharmakologie der Bufogenine, Bufotoxine und der Krötenbasen befasst hat, erhielten wir zuerst 100 g (später nochmals 100 g) reines getrocknetes Parotiden-Sekret der Erdkröte *Bufo bufo bufo L.*, das ihm von Herrn *Lelogeais*, Paris, überlassen worden war⁵⁾. Die aus der näheren und weiteren Umgebung von Paris stammenden Tiere wurden vor der Giftgewinnung von Sachverständigen auf Grund sicherer Merkmale⁶⁾ genau sortiert. Das uns überlassene Material stammte nach den Angaben von Herrn Dr. *Raymond-Hamet* ausschliesslich von *Bufo bufo bufo L.* Das in üblicher Weise gewonnene Drüsensekret wurde bei Raumtemperatur völlig getrocknet. Wir erhielten es als hell ockerfarbiges Pulver, das stark zum Niesen reizte. Hier wird die Untersuchung dieses Materials beschrieben.

Isolierung der Steroide. Das getrocknete Sekret enthält viel Schleimstoffe usw. Um eine möglichst vollständige Extraktion zu erreichen, wurde es zunächst einer groben Verteilungschromatographie unterworfen, wobei als ruhende Phase Wasser auf Kieselgur und als bewegliche Phase zunächst Chloroform, dann Chloroform-n-Butanol-Gemische dienten. So liess sich eine sicher vollständige Extraktion erzielen und auch leicht feststellen, wann diese beendet war. Ausserdem glaubten wir, dass die in dem Sekret wahrscheinlich noch enthaltenen Enzyme bei diesem Verfahren möglichst viel Toxine (Suberylargininabkömmlinge) zu freien Bufogeninen spalten könnten. Erhalten wurden ca. 27% Chloroformextrakt und ca. 11% Chloroform-n-Butanolextrakt. — Der erstere enthielt die Sterine sowie sämtliche (fünf) Genine. Der Chloroform-Butanol-Extrakt enthielt die Toxine, von denen nur eines isoliert wurde. Auffallenderweise konnten wir in keinem der Extrakte Basen nachweisen.

¹⁾ *R. Hüttel & H. Behringer*, Z. physiolog. Chem. **245**, 175 (1937).

²⁾ *K. K. Chen, H. Jensen & A. L. Chen*, J. Pharmacol. exp. Therap. **47**, 307 (1933); *K. K. Chen & A. L. Chen*, ibid. **49**, 548, 561 (1933).

³⁾ *H. Wieland & P. Weyland*, Sitzungsber. Bayr. Akad. Wiss. (Mathem.-physikal. Kl.) **1920**, 329.

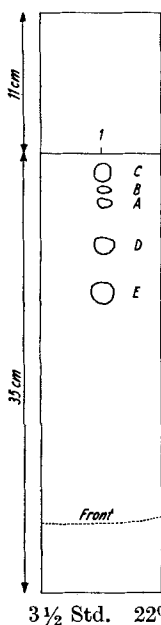
⁴⁾ *H. Wieland & R. Alles*, Ber. deutsch. chem. Ges. **55**, 1789 (1922).

⁵⁾ Wir möchten auch hier Herrn Dr. *Raymond-Hamet* und Herrn *Lelogeais* für dieses äusserst wertvolle Material unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

⁶⁾ Vgl. *E. Schreiber*, Herpetologia europaea, 2. Aufl., S. 210 (Jena 1912).

Isolierung der Bufogenine. Im Chloroformextrakt liessen sich durch Papierchromatographie fünf Bufogenine (A–E) nachweisen (Fig. 1). Zur Trennung wurde zunächst an Al_2O_3 chromatographiert.

Die Reihenfolge der Laufstrecken $E > D > A > B > C$ im Papierchromatogramm und im Verteilungschromatogramm wird bei der Chromatographie an Al_2O_3 teilweise geändert, sie ist dort $D > E > A \cong B > C$.



3 1/2 Std. 22°

Farbreaktion mit SbCl_3

	Tageslicht	UV.-Licht ¹⁾
C (Hellebrigenin) .	orange → grüngelb	gelb
B (Telocinobufagin)	violett → blauviolett	violett
A (Bufotalinin) . .	orange → gelbgrün	gelb
D (Bufotalin) . . .	blauviolett	rotviolett
E (Marinobufagin) .	orange → gelbgrün	gelborange

Fig. 1.

Papierchromatogramm von 0,2 mg Chloroformextrakt. Ruhende Phase: Propylenglykol-Wasser (4:1). Bewegliche Phase: Benzol-Chloroform (1:1), gesättigt mit Propylenglykol-Wasser (4:1).

Aus den ersten Eluaten liessen sich krist. Sterine isolieren, die nicht weiter untersucht wurden. Von den fünf Bufogeninen liess sich die Hauptmenge an Genin D sowie ein Teil des Genins C relativ leicht in Kristallen fassen, die nach Papierchromatographie völlig einheitlich waren. Ausserdem wurden noch reichliche Mengen weiterer Kristalle erhalten, die sich aber nach Papierchromatographie alle als Gemische erwiesen. Nach wiederholter Chromatographie an Al_2O_3 konnten daraus noch etwas D sowie die Hauptmenge von Genin E in reiner Form isoliert werden. In Vorversuchen konnten auch kleine Mengen A und B in dieser Weise rein erhalten werden, doch war die Ausbeute sehr unbefriedigend. Zur weiteren Trennung wurden daher die verbliebenen Gemische von A, B und dem restlichen C einer Verteilungschromatographie unterworfen, wobei Propylenglykol-Wasser

¹⁾ Es wurde eine Hanovia-, „Chromatolite“-UV.-Lampe benützt, die ca. 80% ihres Lichtes bei ca. 254 m μ aussendet.

(4:1) als ruhende und Benzol-Chloroform-Gemische als bewegliche Phase benützt wurden. Die drei Genine A, B und C konnten auf diesem Wege recht glatt voneinander getrennt und weitere Mengen in kristallisierter und papierchromatographisch einheitlicher Form erhalten werden.

Nach Chromatographie des Chloroform-n-Butanol-Extrakts an Al_2O_3 liess sich daraus ein krist. Stoff F (Bufotoxin) gewinnen. Ob noch andere Steroide darin enthalten sind, wurde nicht geprüft. Insgesamt wurden aus 35 g trockenem Sekret die folgenden Ausbeuten erhalten:

- 0,056 g entspr. 0,16% krist. Steringemisch (nicht weiter untersucht),
- 0,340 g entspr. 0,97% Genin A (Bufotalinin)¹⁾,
- 0,116 g entspr. 0,33% Genin B (Telocinobufagin)¹⁾,
- 0,53 g entspr. 1,52% Genin C (Hellebrigenin = Bufotalidin)¹⁾,
- 2,047 g entspr. 5,85% Genin D (Bufotalin)¹⁾,
- 0,75 g entspr. 2,14% Genin E (Marinobufagin)¹⁾,
- 0,377 g entspr. 1,07% Stoff F (Bufotoxin)¹⁾.

Die Farbreaktionen dieser 6 reinen Stoffe mit 84-proz. H_2SO_4 ²⁾ sind in Tab. 1 zusammengestellt, diejenigen mit SbCl_3 ²⁾³⁾ vgl. Fig. 1. Diese Farbreaktionen sind als zusätzliches Kriterium bei Identifizierungen recht nützlich. Es ist jedoch wichtig, dass die Färbungen stets gleichzeitig mit authentischem Vergleichsmaterial durchgeführt werden.

Durch die papierchromatographische Kontrolle ist es weitgehend sichergestellt, dass im Chloroformextrakt ausser den 5 in reiner Form isolierten Stoffen keine anderen Bufogenine in nachweisbaren Mengen vorhanden sind. Hingegen geben die erhaltenen Ausbeuten an Kristallen nur ein ungefähres Bild über die wirklich vorhandenen Mengen an, da bei der Trennung das Hauptgewicht auf Isolierung völlig reiner Präparate gelegt wurde, wobei Verluste unvermeidlich sind. Hingegen ist es unsicher, ob im Chloroform-Butanol-Extrakt ausser dem isolierten krist. Stoff F (Bufotoxin) noch andere Bufotoxine enthalten waren, da dieser Teil nicht so genau untersucht wurde.

Vergleichspräparate. Herr Prof. *H. Wieland* hatte die grosse Freundlichkeit, uns Proben seiner Originalpräparate von Bufotalidin und Bufotalinin für Vergleichszwecke zu überlassen, was für die Identifizierung dieser zwei Stoffe äusserst wertvoll war. Herrn Prof. *K. Meyer* danken wir für die Überlassung reiner Proben von Bufotalin (VII), Marinobufagin (IX) und Telocinobufagin (III).

¹⁾ Identifizierung siehe folgende Kapitel.

²⁾ Analoge Farbreaktionen mit diesen und anderen Bufogeninen vgl. *K. Meyer*^{c)} und *A. Katz*, *Pharmac. Acta Helv.* **29**, 369 (1954).

³⁾ Vgl. auch *P. Zoller & Ch. Tamm*, *Helv.* **36**, 1748, Fussnote 1 (1953).

Die Originalpräparate von Bufotalidin und Bufotalinin wurden im Papierchromatogramm untersucht (vgl. Fig. 2 und 3). Es zeigte sich, dass beide nicht vollkommen einheitlich waren¹⁾.

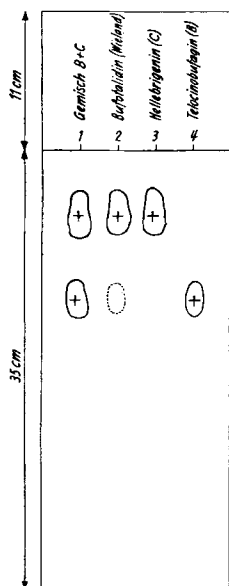


Fig. 2.

5 Std., 23°, Front abgetropft.

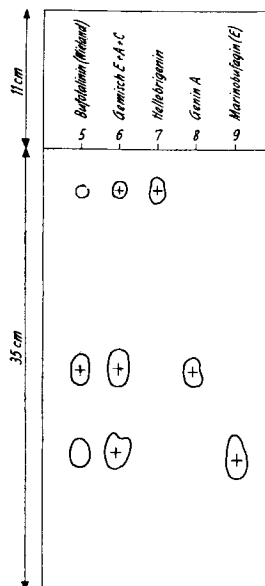


Fig. 3.

5 Std., 23°, Front abgetropft.

Fig. 2 und 3. Papierchromatographie.

Ruhende Phase: Propylenglykol-Wasser (4:1). Bewegliche Phase: Benzol-Chloroform (1:1), gesättigt mit Propylenglykol-Wasser (4:1). In der Photokopie waren nur die mit einem + bezeichneten Flecken sichtbar.

1. Gemisch von 0,1 mg Hellebrigenin und 0,02 mg Telocinobufagin.
2. 0,1 mg Bufotalidin (Originalpräparat *Wieland*).
3. 0,1 mg Hellebrigenin.
4. 0,02 mg Telocinobufagin.
5. 0,1 mg Bufotalinin (Originalpräparat *Wieland*).
6. Gemisch von 0,1 mg „Genin A“, 0,02 mg Marinobufagin und 0,01 mg Hellebrigenin.
7. 0,02 mg Hellebrigenin.
8. 0,04 mg „Genin A“.
9. 0,02 mg Marinobufagin.

Bufotalidin (Präparat *Wieland*) enthielt als Hauptkomponente Hellebrigenin, daneben wenig (ca. 5%) Telocinobufagin. Die Identifizierung geschah auf Grund der Laufstrecke sowie der charakteristischen Farbreaktionen mit SbCl_3 . Für die Abschätzung der

¹⁾ Dies soll keine überhebliche Kritik darstellen. Diese Genine wurden zu einer Zeit isoliert, als die papierchromatische Kontrolle noch nicht ausgearbeitet war. Sie geben mit den anderen hier genannten Bufogeninen leicht Mischkristalle, die sich durch Kristallisation allein kaum völlig trennen lassen. Vor allem ist eine Kontrolle der Reinheit auf einem anderen einfachen Wege kaum möglich.

Menge muss diese Farbreaktion mit grösster Vorsicht benützt werden, da die Farbtintensitäten der verschiedenen Genine sehr verschieden sind. Ein Vergleich mit künstlichen Mischungen (Nr. 1 in Fig. 2) gibt oft einen brauchbaren Anhaltspunkt. Ein besseres quantitatives Mass gibt die direkte Photokopie im gefilterten UV.-Licht. In der verwendeten Ausführungsform¹⁾ ist die Methode allerdings nicht sehr empfindlich, daher gab das Originalpräparat von Bufotalidin in der angewendeten Menge dabei nur einen Fleck, der dem Hellebrigenin entsprach.

Bufotalinin (Originalpräparat *Wieland*) enthielt als Hauptkomponente einen Stoff, der mit unserem „Genin A“ identisch war. Daneben war eine kleine Menge (höchstens 10% oder weniger) Marinobufagin (IX) sowie eine Spur (höchstens ca. 5%) Hellebrigenin (V) darin enthalten.

Identifizierung der isolierten Steroide.

Genin A = Bufotalinin. Da Genin A sich mit der Hauptkomponente des Originalpräparats von *Wieland* als identisch erwies, möchten wir den Namen Bufotalinin für diesen Stoff beibehalten. Die Analysen passten auf die Formel $C_{24}H_{30-32}O_6$, diejenigen des krist. Acetats auf $C_{26}H_{32-34}O_7$. Die wasserstoffärmeren sind wahrscheinlicher und würden mit dem Formelvorschlag von *Wieland* und Mitarb.^{a)} übereinstimmen. Auch die Schmelzpunkte und Drehungen des freien Genins sowie des Acetats stimmten mit den von *Wieland* und Mitarb.^{a)} gefundenen Werten (für das Acetat ist keine Drehung angegeben) befriedigend überein. Bufotalinin enthält möglicherweise eine Aldehydgruppe (siehe unten); wir schlagen die Formel I vor (Begründung siehe unten), die aber noch ganz hypothetisch ist.

Genin B = Telocinobufagin (III). Genin B war nach Smp., Mischprobe, Drehung, Analyse, Farbreaktionen und Papierchromatogramm identisch mit Telocinobufagin (III). Es wurde weiter durch das krist. Acetat (IV) charakterisiert.

Genin C = Hellebrigenin (V) = Bufotalidin *Wieland*. Genin C war nach Smp., Mischprobe, Drehung, Analyse, Farbreaktionen und Papierchromatogramm identisch mit Hellebrigenin (V) und, wie oben erwähnt, nach Papierchromatogramm und Farbreaktionen identisch mit der Hauptkomponente des Originalpräparats von Bufotalidin *Wieland*. Obgleich der Name Bufotalidin älter ist, möchten wir vorschlagen, den Namen Hellebrigenin für diesen Stoff neben Bufotalidin als gleichberechtigt beizubehalten, weil er bereits eingebürgert ist und weil seine Konstitution unter diesem Namen ermittelt wurde¹⁾.

¹⁾ R. Bernasconi u. Mitarb., siehe spätere Mitteilung. Es sind dabei im Chromatogramm mindestens 0,02 mg nötig, um einen Fleck mittlerer Wanderungsgeschwindigkeit noch deutlich zu erhalten.

Auch Genin C wurde durch sein krist. Acetat charakterisiert, das erwartungsgemäss mit Hellebrigeninacetat (VI) identisch war. Die Identität wurde auch durch Vergleich der IR.-Absorptionsspektren (Fig. 4) sowie durch Papierchromatographie (Fig. 5) bestätigt.

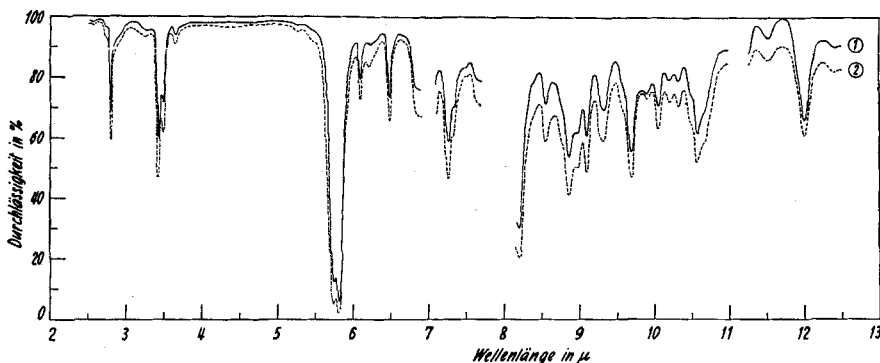


Fig. 4.

IR.-Absorptionsspektren¹⁾ in Methylenchlorid.

Kurve 1 = 3-O-Acetyl-hellebrigenin (aus Genin C aus *Bufo bufo bufo*).

Kurve 2 = 3-O-Acetyl-hellebrigenin (authentisch aus *Helleborus niger*).

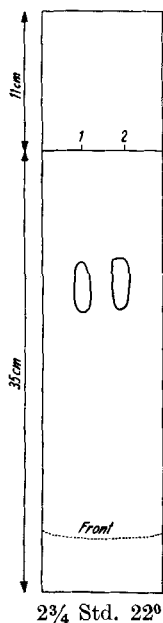


Fig. 5.

SbCl₃-Reaktion für beide Flecke

Tageslicht UV.-Licht

zitronengelb → orangerot
grünlich

Papierchromatographie
von 3-O-Acetyl-hellebrigenin.

Ruhende Phase: Propylenglykol-Wasser (4:1).

Bewegliche Phase: Benzol-Chloroform (1:1), gesättigt mit Propylenglykol-Wasser (4:1).

1 = 0,1 mg 3-O-Acetyl-hellebrigenin aus *Bufo bufo bufo*.

2 = 0,1 mg 3-O-Acetyl-hellebrigenin authentisch aus *Helleborus niger*.

Genin D = Bufotalin (VII). Dieses in grösster Menge erhaltene Genin wurde in gleicher Weise wie die vorgenannten mit dem

¹⁾ Aufgenommen von Herrn Dr. P. Zoller mit einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer, Modell 21.

Bufotalin (VII) von *Wieland & Weil*¹⁾ identifiziert. Auch das krist. Acetat erwies sich erwartungsgemäss mit Bufotalinacetat (VIII) als identisch.

Genin E = Marinobufagin (IX). Genin E wurde auf Grund gleicher Kriterien mit Marinobufagin (IX)¹⁾ identifiziert und ebenso als krist. Acetat (X) charakterisiert.

Stoff F = Bufotoxin (= Vulgarobufotoxin²⁾) (XI). Stoff F zeigte Analysenwerte, die auf die Formel $C_{40}H_{60}O_{10}N_4$ passten. Das UV.-Absorptionsspektrum (Fig. 6) steht mit dieser Formel gut in Einklang. Dieselbe Formel haben *Wieland & Behringer*²⁾ für ihr Bufotoxin (XI) abgeleitet. Auch Smp. und Drehung unseres Präparates stimmten gut mit ihren Daten überein, so dass wir glauben, dass Identität vorliegt. Das Acetat kristallisierte bisher nicht. Weitere Untersuchungen wurden an dem Stoff nicht durchgeführt.

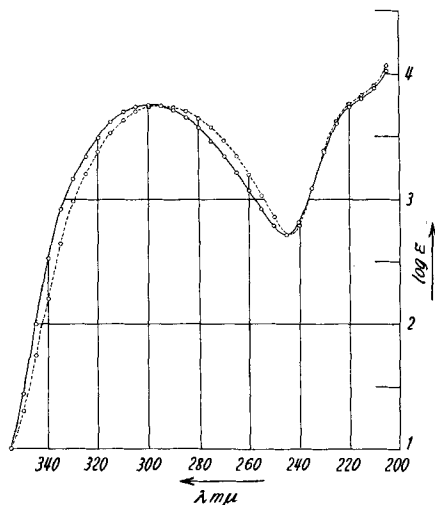


Fig. 6.

UV.-Absorptionsspektren in Alkohol³⁾.

- Kurve V: Hellebrigenin (V) (Subst. C).
Maximum bei 300 mμ, $\log \epsilon = 3,74$,
berechnet auf $C_{24}H_{32}O_6 = 416,53$.
- Kurve XI: Bufotoxin (= Vulgarobufotoxin) (XI).
Maximum bei 295 mμ, $\log \epsilon = 3,74$,
berechnet auf $C_{40}H_{60}O_{10}N_4 \cdot H_2O = 774,93$.

¹⁾ Nomenklatur nach *H. Jensen & K. K. Chen*, J. biol. Chem. **100**, lvii (1933); *K. K. Chen & A. L. Chen*, J. Pharmacol. Exper. Therap. **49**, 514 (1933).

²⁾ Nomenklaturvorschlag von *K. K. Chen, H. Jensen & A. L. Chen*, J. Pharmacol. & exp. Therap. **47**, 307 (1933). Diese Autoren schlagen vor, dass der *Wieland*'sche Name Bufotoxin als Gruppenbezeichnung für alle Suberylargininderivate der verschiedenen Bufogenine verwendet wird.

³⁾ Aufgenommen von Herrn Dr. *P. Zoller* mit einem „Unicam SP 500“-Spektrophotometer.

Diskussion der Ergebnisse. In Übereinstimmung mit den Befunden von *Wieland* u. Mitarb. stellt Bufotalin (VII) die Hauptkomponente des Giftes dar. Auch die von ihnen isolierten Stoffe Bufotalinin (I), Hellebrigenin (=Bufotalidin) (V) und Bufotoxin (XI) haben wir erhalten. Telocinobufagin (III) und Marinobufagin (IX) wurden von uns zwar erstmals in reiner Form aus dem Sekret der Erdkröte *Bufo bufo bufo* L. isoliert. Wie erwähnt, konnten wir aber kleine Mengen dieser zwei Stoffe papierchromatographisch recht eindeutig auch in den Originalpräparaten von Bufotalidin und Bufotalinin von *Wieland* u. Mitarb. nachweisen. Es steht somit fest, dass sie auch in dem von ihnen untersuchten Gift enthalten waren. Die chemischen Befunde sprechen somit nicht gegen die Annahme, dass sie, wie sie angeben, tatsächlich *Bufo bufo bufo* L. untersucht haben¹⁾.

Das Resultat steht auch mit früheren Befunden^{c)} im Einklang, wonach jede Krötenart neben dem für die betreffende Species charakteristischen Haupt-Genin noch kleinere Mengen von einem oder mehreren weiteren Bufogeninen produziert. Bisher wurde nur aus der chinesischen Droge Ch'an Su eine grössere Anzahl (neun) reine Bufogenine isoliert^{c)}, doch ist es unsicher, ob dieses Material immer nur aus einer Krötenart stammt. Aus Sekreten von einheitlichem Tiermaterial wurden bisher meist nur 1–2 reine Bufogenine erhalten. Es ist aber möglich, dass unter Verwendung leistungsfähiger Methoden und papierchromatischer Kontrolle auch aus solchem Material noch weitere Bufogenine isolierbar sein werden.

¹⁾ Aus dem Sekret von *Bufo viridis viridis* Laur. konnten K. K. Chen, H. Jensen & A. L. Chen, Proc. Soc. exper. Biol. and Med. **29**, 905 (1931–1932); J. Pharmacol. exp. Therap. **49**, 14 (1933) neben anderen Stoffen Viridobufagin (C₂₃H₃₄O₅), Smp. 255° (Diacetat Smp. 253°), und Viridobufotoxin (C₃₇H₆₀O₁₀N₄), Smp. 198–199°, isolieren. Einen Stoff von den Eigenschaften des Viridobufagins haben *Wieland* & Mitarb. aus ihren Kröten nicht erhalten. Dies spricht stark dafür, dass sie *Bufo bufo bufo* L. untersucht haben. In Frankreich soll *Bufo viridis viridis* nicht vorkommen, hingegen ausser *Bufo bufo bufo* die einzige dritte europäische Krötenart *Bufo calamita* Laur.

^{a)} H. *Wieland*, G. *Hesse* & R. *Hüttel*, Liebigs Ann. Chem. **524**, 203 (1936).

^{b)} Exp. Teil dieser Arbeit.

^{c)} K. *Meyer*, Pharmac. Acta Helv. **24**, 222 (1949).

^{d)} K. *Meyer*, Helv. **32**, 1953 (1949).

^{e)} J. *Schmutz*, Pharmac. Acta Helv. **22**, 373 (1947).

^{f)} J. *Schmutz*, Helv. **32**, 1442 (1949).

^{g)} H. *Wieland* & G. *Hesse*, Liebigs Ann. Chem. **517**, 22 (1935).

^{h)} H. *Wieland* & F. J. *Weil*, Ber. deutsch. chem. Ges. **46**, 3315 (1913).

ⁱ⁾ K. *Meyer*, Helv. **32**, 1993 (1949).

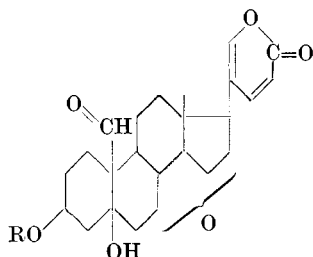
^{k)} H. *Jensen* & K. K. *Chen*, J. biol. Chemistry **87**, 755 (1930).

^{m)} K. *Meyer*, Helv. **34**, 2147 (1951).

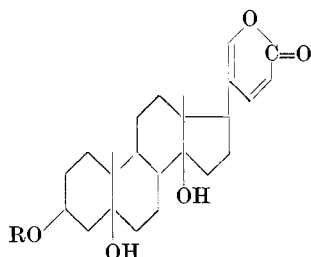
ⁿ⁾ S. *Pataki* & K. *Meyer*, spätere Mitteilung.

^{v)} H. *Wieland* & H. *Behringer*, Liebigs Ann. Chem. **549**, 209 (1941).

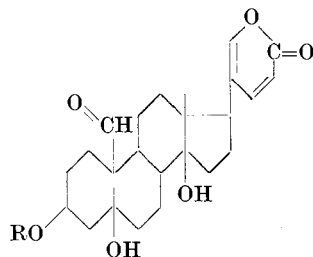
^{u)} Vgl. auch A. *Buzas* & T. *Reichstein*, Helv. **31**, 110 (1948).



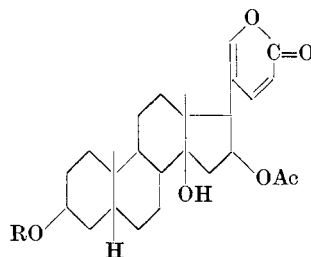
- I (R = H) (A) Bufotalinin¹⁾
 F. 233° [+ 14,1 80% Al]^{a)}
 F. 195—201° [+ 19,2 Chf]^{b)}
 II (R = Ac) F. 247°^{a)} F. 235—243°
 [+ 30,6 Chf]^{b)}



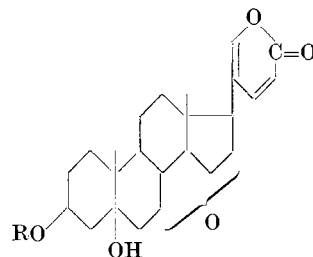
- III (R = H) (B) Telocinobufagin²⁾
 F. 160°/210° [+ 4,4 Chf]^{c)}
 IV (R = Ac) F. 275—281°
 [+ 22,9 Chf]^{c)}^{d)}



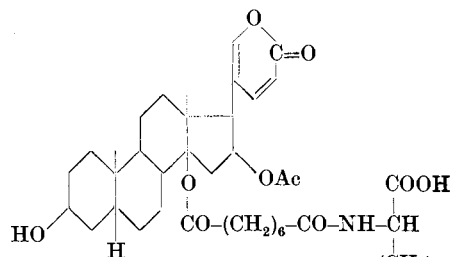
- V (R = H) (C) Hellebrigenin = Bufo-
 talidin³⁾^{a)}^{e)}
 F. 236—239° [+ 17,8 An]^{e)}^{f)}
 VI (R = Ac) F. 242—247° [+ 33,7 Chf]^{e)}^{f)}



- VII (R = H) (D) Bufotalin⁴⁾
 F. 148°/222° [+ 5,4 Chf]^{a)}^{h)}
 VIII (R = Ac) F. 263—269°
 [+ 3,7 Chf]^{c)}ⁱ⁾



- IX (R = H) (E) Marinobufagin⁵⁾
 F. 205—214°^{k)} F. 224°
 [+ 10,0 Chf]^{m)}
 X (R = Ac) F. 194—220°
 [+ 25,7 Chf]^{m)}



- XI (F) Bufotoxin⁴⁾
 (= Vulgarobufotoxin)
 F. 204° [+ 3,6 Me]^{a)}^{p)}
 COOH
 |
 CH
 |
 (CH₂)₃
 |
 NH
 |
 C=NH
 |
 NH₂

Ac = CH₃CO—. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die spez. Drehung für Na-Licht in folgenden Lösungsmitteln an: Al = Äthanol, An = Aceton, Chf = Chloroform, Me = Methanol.

¹⁾ Hypothetische Formel, Begründung vgl. Text.

²⁾ Formel nach Meyer^{d)}.

³⁾ Formel nach Schmutz^{f)}^{q)}.

⁴⁾ Formel nach Meyer¹⁾.

⁵⁾ Hypothetische Teilformel nach Pataki & Meyerⁿ⁾.

Tabelle 1.
Farbreaktionen mit 84-proz. H_2SO_4 ¹⁾ nach der angegebenen Zeit.

Substanz	Im ersten Moment	5'	10'	30'	1 Std.	1 ½ Std.	2 Std.	3 Std.
A. Bufotalin (I)	gelb (Grünstich)	gelb-orange	orange-ocker	orange-ocker	honiggelb (Grünstich)	gelb-grün	grün-gelb	blass gelblich-ocker
B. Telocinobufagin (III)	lachsrot	lachsrot (violetter Rand)	lachsrot (blauvioletter Rand)	violett-blau	hellblau	grün-blau	blau-grün	grünlich-gelb
C. Hellebrigenin (V)	gelb (Grünstich)	orange-rot	orange-rot	orange-braun (Grünstich)	gelbbraun (Grünstich)	gelb-grün	gelb-grün	blass grünlich-gelb
D. Bufotalin (VII)	gelb-orange	gelb (violetter Rand)	gelbbraun (violetter Rand)	blassviolett bläulich-grau	blass blau-grau	blass grau-bläulich	sehr blass gelblich-grün	sehr blass gelbgrün
E. Marinobufagin (IX)	orange	orange-braun	orange-braun (Grünstich)	dunkel grün-oliv	dunkel-grün	dunkel-grün	olive	schmutzig olive-braun
F. Vulgarobufotoxin (XI)	blass gelb	blass gelb (violetter Rand)	blass gelb (violetter Rand)	blass violett-weinrot	blass violett-weinrot	blass grau-violett	sehr blass grau-blau	sehr blass grau-gelb

¹⁾ Ausführung vgl. *J. v. Euw & T. Reichstein, Helv. 31, 883 (1948)*.

²⁾ Über das Verhalten dieser und weiterer Bufogenine bei der Behandlung mit konz. H_2SO_4 vgl. *K. Meyer^{c)}*.

Es mag zunächst auffallend scheinen, dass wir aus dem Sekret keine Basen erhielten; in den Eluatn der verschiedenen Verteilungs-chromatographien waren jedenfalls keine greifbaren Mengen von Basen nachweisbar. Es ist aber möglich, dass sie aus der schwach sauren wässrigen Phase dabei nicht eluiert wurden. Da uns die Basen in dieser Arbeit nicht interessierten, wurde die Frage nicht abgeklärt.

Formulierung der einzelnen Stoffe und Angaben über Vorkommen.

Bei den genannten sechs Stoffen ist die Konstitution nur bei Telocinobufagin (III), Hellebrigenin (V), Bufotalin (VII) und Bufotoxin (XI) völlig oder weitgehend abgeklärt.

Bufotalinin wurde erstmals von *Wieland* u. Mitarb.¹⁾ isoliert und zwar nach ihren Angaben aus *Bufo bufo bufo*, während *Chen* u. Mitarb.²⁾ vermuten, dass es sich um *Bufo viridis viridis* *Laur.* gehandelt haben könnte. Nach unseren Befunden dürfte es sicher sein, dass der Stoff in *Bufo bufo bufo* vorkommt. Bufotalinin wurde bisher noch nie abgebaut. Wir haben das Acetat mit CrO_3 oxydiert und erhielten dabei neben krist. neutralen Anteilen eine krist. Säure, deren Analyse auf die erwartete Formel $\text{C}_{26}\text{H}_{32-34}\text{O}_8$ passte. Ihr Methylester kristallisierte bisher nicht. Die Säure sowie der Neutralstoff müssen noch weiter untersucht werden. Das vorläufige Resultat lässt es als möglich erscheinen, dass Bufotalinin eine Aldehydgruppe enthält. Die analytischen Befunde von *Wieland* u. Mitarb. wären damit verträglich. Ausserdem hatte Herr Dr. *Chen*³⁾ die Freundlichkeit, das reine Bufotalinin biologisch zu prüfen. Der Stoff verhielt sich dabei sehr ähnlich wie Marinobufagin (siehe unten), war aber toxischer. An der Katze zeigte er wie dieses eine ausgesprochen krampferzeugende Wirkung. Die Wirkung auf das Herz wurde erst deutlich, wenn die Krampfwirkung durch ein passendes Narkotikum⁴⁾ zurückgedrängt wurde. Unter solchen Bedingungen wurden die in Tab. 2 angegebenen Werte gefunden.

Am Frosch waren Bufotalinin und Marinobufagin nur sehr schwach herzwirksam. Im Vordergrund stand die Krampfwirkung. Die bisherigen Resultate lassen es daher als möglich erscheinen, dass Bufotalinin ein Derivat des Marinobufagins (IX) ist, bei dem die Methylgruppe an C-10 durch eine Aldehydgruppe ersetzt ist. Aus diesem

¹⁾ *Wieland & Hesse*²⁾ erwähnen, dass Bufotalinin erstmals von *Harry Meyer* isoliert worden sei. Genauere Angaben darüber konnten wir nicht finden.

²⁾ *K. K. Chen, H. Jensen & A. L. Chen*, J. Pharmacol. exp. Therap. **47**, 307 (1933); *K. K. Chen & A. L. Chen*, *ibid.* **49**, 48 (1933).

³⁾ Wir danken Herrn Dr. *K. K. Chen*, The Lilly Research Laboratories, *Eli Lilly & Co.*, Indianapolis, USA, auch hier bestens für die Überlassung seiner Resultate (Briefe vom 8. 3. 1954 und 8. 7. 1954). Er wird über die pharmakologischen Versuche an anderem Ort berichten.

⁴⁾ Äthernarkose war dazu ungenügend, hingegen waren Barbiturate geeignet.

Grunde schlagen wir die hypothetische Formel I für diesen Stoff vor. Versuche, die Richtigkeit dieser Formel zu prüfen, sind im Gange.

Tabelle 2.
Biologische Prüfungen.

Substanz	Zahl der verwendeten Tiere	Geometrisches Mittel der letalen Dosis in mg/kg Katze nach Anästhesie mit Na-Secobarbital
Marinobufagin ¹⁾ aus <i>Bufo marinus</i> .	10	1,489 \pm 0,0908
Marinobufagin ²⁾ aus <i>Bufo bufo bufo</i> .	10	1,552 \pm 0,1226
Bufotalin ²⁾ aus <i>Bufo bufo bufo</i> . .	6	0,6190 \pm 0,1190

Telocinobufagin (III) ist von *Meyer*, zuerst aus Ch'an Su^{c)}, dann aus dem Sekret von *Bufo marinus*^{m)} isoliert worden; er hat auch die Konstitution aufgeklärt^{d)}.

Hellebrigenin (V) ist zuerst von *Schmütz*^{e)} durch Abbau von Hellebrin (aus *Helleborus niger*) erhalten worden; er hat auch die Konstitution abgeklärt^{f)}. Die Isolierung dieses Stoffes aus dem Krötensekret ist von besonderem Interesse, weil es das erste Genin ist, das sowohl aus pflanzlichem wie aus tierischem Material erhalten werden konnte. *Tschesche & Höttemann*³⁾ glaubten zwar vor kurzem einen solchen Fall bei der Untersuchung des „Transvaalins“ aus *Urginea burkei* bereits aufgedeckt zu haben. Danach sollte „Transvaalin“ als Aglykon Bufalin enthalten, das bisher nur aus Krötengift erhalten worden war⁴⁾⁵⁾. Nach *Zoller & Tamm*⁶⁾ ist „Transvaalin“ jedoch mit Scillaren A identisch, das nach *Stoll* u. Mitarb.⁷⁾ als Aglykon Scillarenin enthält. Letzteres ist bisher in tierischem Material noch nie aufgefunden worden. Herr Prof. *Tschesche* hatte die Freundlichkeit, uns mitzuteilen⁸⁾, dass der Befund von *Höttemann* auf einem Irrtum beruht, und dass er das Resultat von *Zoller & Tamm* bestätigen kann.

Bufotalin (VII) ist, wie erwähnt, zuerst von *Wieland & Weil*^{h)} isoliert worden. *K. Meyer*^{c)} konnte es auch aus Ch'an Su erhalten. Er hat auch die Konstitution weitgehend abgeklärtⁱ⁾, wobei nur die räumliche Lage der Acetoxygruppe an C-16 unsicher blieb. Sie ist wahrscheinlich β -ständig angeordnet⁹⁾.

¹⁾ Chromatographisch gereinigtes Präparat von *K. Meyer*^{m)}.

²⁾ Präparat dieser Arbeit.

³⁾ *R. Tschesche & K. H. Höttemann*, Chem. Ber. **86**, 392 (1953).

⁴⁾ *M. Kotake & K. Kuwada*, Sc. Pap. Inst. Phys. and Chem. Research (Tokyo) **36**, 106 (1939); Chem. Zbl. **1939** II, 1681.

⁵⁾ Weitere Literatur und Konstitution vgl. *K. Meyer*^{c)}, sowie Helv. **32**, 1238 (1949).

⁶⁾ *P. Zoller & Ch. Tamm*, Helv. **36**, 1744 (1953).

⁷⁾ *A. Stoll, J. Renz & A. Brack*, Helv. **34**, 2301 (1951); **35**, 1934 (1952).

⁸⁾ Privatmitteilung vom 4. Juni 1954. Wir danken Herrn Prof. *R. Tschesche* auch hier für diese Mitteilung und sein Einverständnis, sie in dieser Publikation zu verwenden.

⁹⁾ Vgl. *J. A. Moore*, Helv. **37**, 659 (1954).

Marinobufagin ist zuerst von *Abel & Macht*¹⁾ aus *Bufo marinus*, dann von *Deulofeu & Mendive*²⁾ aus der nordamerikanischen *Bufo paracnemis* isoliert und zunächst als Bufagin bezeichnet worden. Der Name Marinobufagin ist von *Jensen & Chen*³⁾ vorgeschlagen worden; er ist zweckmässig und hat sich eingebürgert. Ein sicher einheitliches chromatographisch gereinigtes Präparat von Marinobufagin ist von *K. Meyer*^{m)} beschrieben worden. Es zeigte nach *Chen* im Tierversuch (an der Katze und am Frosch) merklich andere Eigenschaften als die früheren Präparate⁴⁾, die wahrscheinlich mit Telo-cinobufagin verunreinigt warenⁿ⁾. Beim reinen Stoff steht eine Krampfwirkung im Vordergrund. Die Herzwirkung ist relativ schwach (vgl. Tab. 2) und kann erst beobachtet werden, wenn die Krampfwirkung durch ein passendes Narkotikum unterdrückt wird⁵⁾. Die Konstitution ist noch nicht bewiesen. *Pataki & Meyer*ⁿ⁾ schlagen die gut begründete Teilformel IX vor, die hier benützt wird.

Bufotoxin (= Vulgarobufotoxin) (XI) ist zuerst von *Wieland* u. Mitarb. isoliert⁶⁾ und eingehend untersucht worden^{a) p)}. Ihre Formel^{p)} ist entsprechend den Arbeiten von *Meyer*¹⁾ über Bufotalin in XI abzuändern, die wir hier benützen.

Für diese Arbeit standen uns Mittel aus den *Arbeitsbeschäftigungskrediten des Bundes* zur Verfügung, wofür auch hier bestens gedankt sei. Der eine von uns (*H. R. U.*) dankt ferner für einen Beitrag aus einem Stipendium des Research Grant Committee der *Eli Lilly & Company*, Indianapolis USA, der ihm die Ausführung der Arbeit wesentlich erleichterte.

Experimenteller Teil.

Alle Smp. wurden auf dem *Kofler-Block* bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze in verwendeter Ausführungsform bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chloroform-Äther (1:3) (oder in anderem Lösungsmittel, falls erwähnt), Waschen mit 2-n. HCl, 2-n. Sodalösung und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen, zuletzt im Vakuum. Zur Adsorptionsschromatographie nach dem Durchlaufverfahren⁷⁾ diente Al_2O_3 , das ohne Anwendung von Säure von Alkali befreit⁸⁾, aber nur bei 180–190° reaktiviert wurde, oder „Silikatgemisch“⁹⁾. Die Verteilungsschromatogramme wurden prinzipiell nach *Hegedüs* u. Mitarb.¹⁰⁾ ausgeführt und die verwendeten Lösungsmittel wie dort angegeben gereinigt. Substanzproben zur Drehung wurden 1 Std. bei 60–70° und 0,02 Torr getrocknet; zur Analyse, wo nichts anderes erwähnt, 5 Std. bei 0,01 Torr und 100° mit Einwaage im Schweinchen. Alle Verhältniszahlen, z. B. (1:3) usw., bedeuten Volumverhältnisse. In den Tabellen und im Text gelten die folgenden Abkürzungen: Ae = Äther, Al = Äthanol, An = Aceton, Bz = Benzol, Chf = Chloroform, Me = Methanol, Pe = Petroläther Sdp. 50–80°.

¹⁾ *J. J. Abel & D. I. Macht*, *J. Pharmacol. exp. Therap.* **3**, 319 (1911–1912).

²⁾ *V. Deulofeu & J. R. Mendive*, *Liebigs Ann. Chem.* **534**, 288 (1938).

³⁾ *H. Jensen & K. K. Chen*, *J. biol. Chemistry* **100**, lviii (1933).

⁴⁾ *K. K. Chen & A. L. Chen*, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **49**, 514 (1933).

⁵⁾ Briefe von Herrn Dr. *K. K. Chen* vom 8. 3. 1954 und 8. 7. 1954.

⁶⁾ *H. Wieland & R. Alles*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **55**, 1789 (1922).

⁷⁾ *T. Reichstein & C. W. Shoppee*, *Disc. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).

⁸⁾ *J. v. Euv., A. Lardon & T. Reichstein*, *Helv.* **27**, 1292 (1944) Fussnote 2.

⁹⁾ *W. Rittel, A. Hunger & T. Reichstein*, *Helv.* **35**, 434 (1952).

¹⁰⁾ *H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein*, *Helv.* **36**, 357 (1953).

Ausführung der Papierschromatographie. Es wurde zuerst das System Benzol-Methanol-Wasser nach *Bush*¹⁾ verwendet. Es ist sehr einfach anzuwenden und arbeitet rasch. Die R_F -Werte waren dabei etwas schwankend, und die meisten Bufogenine zeigten Schwanzbildung. Sehr gute Ergebnisse zeigte das folgende, etwas modifizierte *Zaffaroni*-System²⁾, das uns von Herrn Prof. K. Meyer & Frl. R. Bolliger zur Papierschromatographie von Bufogeninen besonders empfohlen wurde. Es wurde wie folgt Verfahren:

Verwendet wurde *Whatman*-Papier Nr. 1, in der Faserrichtung in Streifen von passender Breite und ca. 46 cm Länge geschnitten und Startlinie, Auftragspunkt und Nummern mit Bleistift markiert. Dann wurde durch eine Mischung von 400 cm³ Propylenglykol, 100 cm³ Wasser und 1000 cm³ Aceton gezogen, senkrecht mit der Startlinie oben aufgehängt und an der Luft ca. 8 Min. trocknen gelassen, bis das Aceton völlig verdampft war. Dann legte man das imprägnierte Blatt auf eine trockene Filterpapierunterlage und trug an den Startpunkten die geeigneten Mengen (0,02–0,1 mg) Substanz in möglichst wenig Methanol gelöst auf. Nach Trocknung (ca. 5 Min.) wurde in die Kammer gehängt und mit Benzol-Chloroform (1:1), das durch Schütteln mit Propylenglykol-Wasser (4:1) gesättigt war, absteigend chromatographiert. Benötigte Laufzeit für gute Auflösung 3–46 Std. Die Front erreichte den unteren Papierrand bei 20–26^o nach ca. 3–6 Std. Das Lösungsmittel wurde, wenn eine Steigerung der Laufstrecke erwünscht war, abtropfen gelassen.

Hierauf wurde das Blatt 30 Min. im Trockenschrank bei 75^o getrocknet. Wenn eine Photokopie erwünscht war, wurde nach *Bernasconi* u. Mitarb.³⁾ verfahren. Dann wurde mit 20-proz. SbCl₃ in Chloroform besprüht und 5 Min. im Trockenschrank auf 75^o erwärmt. Die entstandenen Farbflecke waren in der Regel bereits im Tageslicht sehr deutlich und charakteristisch⁴⁾. Wenn nötig, wurden sie auch unter der UV.-Lampe verglichen. Das Verfahren gab fast stets saubere, runde Flecken ohne Schwanzbildung.

Die Papierschromatographie ist eines der bequemsten und sichersten Verfahren, um die Bufogenine auf Einheitlichkeit zu prüfen, da oft auch grobe Verunreinigungen sich weder durch Smp., Drehung noch Analyse verraten.

Vortrennung des getrockneten Sekrets durch grobe Verteilungschromatographie. Nach einigen Vorversuchen wurde folgendes Verfahren gewählt: 35 g trockenes Sekret (hellbräunliches Pulver) wurde mit 100 cm³ Wasser angerührt und 2 Std. auf der Maschine geschüttelt. Die äusserlich homogene, aber trübe Lösung zeigte ein pH = ca. 6; sie wurde mit 100 g gereinigter⁵⁾ Kieselgur (Hyflo Super Cel) vermischt und das so erhaltene trockene Pulver mit frisch dest. Chloroform auf die mit Chloroform bereitete Säule (Nr. 3)⁶⁾ gebracht, die mit 1 kg Kieselgur-Wasser (1:1)⁶⁾ beschickt war. Anschliessend wurde chromatographiert, Laufgeschwindigkeit ca. 200 cm³ pro 12 Std., was jeweils einer Fraktion entsprach.

Die Fraktionen 1–12 (eluiert mit reinem Chloroform) gaben beim Eindampfen im Vakuum insgesamt 9,55 g Chloroformextrakt als orangegelben Schaum. Von diesem entfielen auf Fraktion 12 nur noch 29 mg.

Die Fraktionen 13–17 (eluiert mit Chloroform-Butanol (9:1) und (8:2)) gaben beim Eindampfen im Vakuum insgesamt 3,476 g Chloroform-Butanol-Extrakt als fast farblosen Schaum. Auch hier gab die letzte Fraktion Nr. 17 nur noch sehr wenig Rückstand. In

¹⁾ I. E. Bush, *Biochem. J.* **50**, 370 (1952); I. E. Bush & D. A. H. Taylor, *Biochem. J.* **52**, 643 (1952).

²⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, *Science* **111**, 6 (1950); iidem, *J. biol. Chemistry* **188**, 763 (1951).

³⁾ R. Bernasconi u. Mitarb., siehe spätere Mitteilung.

⁴⁾ Die Farbreaktionen mit SbCl₃ waren auf den durch Propylenglykol-Wasser gezogenen Papierstreifen auch nach halbstündigem Trocknen bei 75^o etwas verschieden von denjenigen, die auf nicht behandeltem Papier erhalten wurden.

⁵⁾ H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein, *Helv.* **36**, 357 (1953).

⁶⁾ Hier handelt es sich ausnahmsweise um Gewichtsteile.

einem Vorversuch hatte sich gezeigt, dass auch mit höherer Butanol-Konzentration keine merklichen Mengen weiterer Bufotoxine eluierbar waren.

Anschließend wurde der Inhalt der Säule noch zweimal mit heissem Methanol extrahiert. Diese Auszüge gaben beim Eindampfen im Vakuum einen braunen, stark schäumenden wässrigen Extrakt, der bisher noch nicht untersucht wurde.

Trennung des Chloroform-Extrakts. *Prüfung auf Basen.* Die 9,55 g Chf-Extrakt wurden in ca. 100 cm³ Chf gelöst und bei 0° mehrmals mit verd. HCl und Sodalösung ausgeschüttelt. Alle Auszüge wurden der Reihe nach noch zweimal mit je ca. 100 cm³ Chf nachgeschüttelt. Aus der Sodalösung wurden die Säuren mit HCl und aus den HCl-Auszügen die Basen mit Na₂CO₃ freigesetzt und ebenfalls mit Chf ausgeschüttelt. Erhalten wurden 9,411 g neutrale, 31 mg saure und 3 mg basische Anteile. Die zwei letztgenannten wurden nicht untersucht.

Vortrennung durch Chromatographie an Al₂O₃. Die 9,411 g Chloroform-Extrakt wurden an 300 g Al₂O₃ chromatographiert. Zum Eluieren jeder Fraktion dienten je 900 cm³ der in Tab. 3 genannten Lösungsmittel.

Die Fraktionen 1–2 blieben amorph.

Die Fraktionen 3–4 gaben aus Äther-Methanol 56 mg farblose Blättchen, Smp. 140–150°, leichtlöslich in Äther, schwer in Methanol. Es dürfte sich um das bekannte Steringemisch handeln. Das Material wurde nicht weiter untersucht.

Die Fraktionen 10–20 (zusammen = 2,547 g) gaben aus Aceton-Äther 1,611 g krist. Genin D (Bufotalin). Die vereinigten Mutterlaugen lieferten noch 46 mg gleiche Kristalle.

Die Fraktionen 21–24 (zusammen 1,502 g) waren Gemische von D + E. Durch nochmalige sorgfältige Chromatographie an Al₂O₃ liessen sich daraus noch 0,39 g reines Genin D und 0,75 g reines Genin E in Kristallen erhalten.

Die Fraktionen 25–26 (1,879 g) waren Gemische, die durch Verteilungschromatographie (siehe unten) getrennt wurden.

Die Fraktionen 27–30 (961 mg) gaben aus Me-Ae 107 mg reines Genin C.

Trennung des Gemisches der Genine A, B und C durch Verteilungschromatographie. Es wurde Säule Nr. 2 verwendet. 350 g trockene gereinigte Kieselgur (Hyflo Super Cel) wurden mit 350 g Propylenglykol-Wasser (4:1) vermischt, in 2 l Benzol-Chloroform (1:1) suspendiert, 15 Min. auf der Maschine geschüttelt und dann in die Säule eingefüllt und gut gestopft. Es wurde zuerst 2 Tage mit Benzol-Chloroform (1:1), das mit Propylenglykol-Wasser (4:1) knapp gesättigt war, gewaschen. Dann wurden die 2,039 g Substanzgemisch (1,879 g Fr. 25 + 26 von Tab. 3 und 0,16 g Mutterlaugen von Genin A aus Vorversuch)¹⁾ in 5 cm³ Chloroform gelöst, die Lösung mit 5 cm³ Benzol verdünnt, mit 20 g trockener gereinigter Kieselgur vermischt auf die Säule gegeben, worauf die Chromatographie sofort mit Benzol-Chloroform (1:1), knapp gesättigt mit Propylenglykol-Wasser (4:1), begonnen wurde. Es wurden pro Tag ca. 5 Fraktionen von zunächst je 80–110 cm³, am Schluss von je ca. 200–300 cm³ abgetrennt, was einer Laufgeschwindigkeit von 17–23 cm³ pro Std. am Anfang entspricht. Die Fraktionen wurden einzeln im Vakuum bei 50–60° eingedampft und der Rückstand zur Entfernung der Reste von Propylenglykol bei 0,02 Torr und 40° getrocknet, was jeweils ca. 20–30 Min. in Anspruch nahm. Über das Resultat orientiert Tab. 4.

Die Fraktionen 1–10 kristallisierten nicht.

Die Fraktionen 11–18 gaben aus Me-Ae 370 mg reines Genin A.

Die Fraktionen 19–40 waren amorph.

Die Fraktionen 41–55 gaben aus reinem Me 126 mg reines Genin B.

Die Fraktionen 56–73 blieben amorph.

Die Fraktionen 74–77 gaben aus Me-Ae 328 mg reines Genin C.

Die Säule wurde hierauf mit ca. 1000 cm³ Methanol ausgewaschen. Das Filtrat wurde bei 12 Torr und 50° zunächst von Methanol und Wasser befreit, dann wurde bei ca.

¹⁾ Die 2,039 g Material entsprechen somit ca. 38 g getrocknetem Sekret, was bei der Berechnung der totalen Ausbeute berücksichtigt wurde.

0,1 Torr und 50° das Propylenglykol weitmöglichst abdestilliert. Der Rückstand wurde mit etwas Wasser versetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit Wasser und KHCO_3 gewaschene und getrocknete Lösung gab beim Eindampfen 1,02 g teilw. krist. Rückstand, der an 10 g Al_2O_3 grob chromatographiert wurde. Die mit Chloroform eluierten Anteile (0,976 g) gaben aus Me-Ae 209 mg krist. Genin C. Die mit Chf-Me (bis 20% Me-Gehalt) eluierten Anteile (133 mg) kristallisierten nicht.

Tabelle 3.

Vortrennung von 9,411 g Chf-Extrakt an Al_2O_3

Fraktions-nummer	Eluiermittel	Eindampfrückstand					
		Menge in mg	Papierchromatogramm	Habitus, bei Krist. Smp.	Kristalle		
					aus	Menge in mg	Papierchromatogramm
1	Bz-Chf (9:1)	43		amorph			
2	„ „ (8:2)	14		„			
3	„ „ (8:2)	113		142—148°	Ae-Me	} 56	
4	„ „ (8:2)	93		140—150°	„ „		
5	„ „ (8:2)	21		amorph			
6	„ „ (8:2)	13		„			
7	„ „ (8:2)	12		„			
8	„ „ (8:2)	37		„			
9	„ „ (3:2)	77		„			
10	„ „ (3:2)	156		200—220°	An-Ae	58	D
11	„ „ (3:2)	282		krist.	„ „	167	
12	„ „ (3:2)	179		„	„ „	130	
13	„ „ (3:2)	156		„	„ „	110	
14	„ „ (3:2)	157		„	„ „	112	
15	„ „ (3:2)	113		„	„ „	84	
16	„ „ (3:2)	110		„	„ „	68	
17	„ „ (2:3)	291		„	„ „	136	
18	„ „ (2:3)	489		204—220°	„ „	315	D
19	„ „ (2:3)	422		krist.	„ „	286	
20	„ „ (2:3)	192		202—220°	„ „	145	D
21	„ „ (2:3)	157		207—217	„ „	86	D + E
22	„ „ (2:3)	121		krist.	„ „	15	
23	„ „ (2:3)	194		210—220°	„ „	85	D + E
24	Chf	1030	D + E	210—215°	Me-Ae	593	
25	„	1275	A + B + C + Spur E	krist.			
26	„	604	C + Spur A + B	krist.	„ „	300	
27	„	500	C	204—219°	„ „	39	
28	„	179		krist.	„ „	9	
29	„	70		„	„ „	22	
30	Chf-Me (9:1)	212		147—151°	„ „	37	
31	„ „ (8:2)	54		amorph			

Total 7,366 g (78%)

Tabelle 4.

Verteilungschromatographie von 2,039 g Gemisch der Genine A, B und C.

Fraktions- num- mer	Eluiermittel		Eindampfrückstand				
			roh		Kristalle		
	Art	Menge in cm ³	Menge in mg	Habitus, bei Krist. Smp.	aus	Menge Rohkrist. in mg	Papier- chro- matogr.
1	Bz-Chf (1:1)	90	Spur	amorph, braun			
2	..	90	6			
3	..	68	7			
4	..	122	24			
5	..	127	27			
6	..	85	14			
7	..	83	44			
8	..	104	127			
9	..	103	63			
10	..	103	102			
11	..	102	144	198—212°	Me-Ae	23	A
12	..	90	348		93	A
13	..	80	238		75	
14	..	80	191		79	
15	..	80	127	199—214°	47	A
16	..	50	79		19	
17	..	63	55		}	34	A
18	..	93	28	198—212°			
19	..	96	13	amorph, braun			
20	..	97					
21	..	91	16			
22	..	94					
23	..	79	17			
24	..	80					
25	..	81	19			
26	..	81					
27	..	81	10			
28	..	81					
29	..	84	44			
30	..	84					
31	..	84	13			
32	..	85					
33	..	84	8			
34	..	85					
35	..	86	8			
36	..	85					
37	..	83					

Tabelle 4 (Fortsetzung).

Fraktionsnummer	Eluiermittel		Eindampfrückstand				
			roh		Kristalle		
	Art	Menge in cm ³	Menge in mg	Habitus, bei Krist. Smp.	aus	Menge Rohkrist. in mg	Papierchromatogr.
38	Bz-Chf (1:1)	80	9	amorph, braun	Me	6	B
39	„ „	85					
40	„ „	83					
41	„ „	80	27	150—157°/ 191—205°	„	18	B
42	„ „	81					
43	„ „	82					
44	„ „	62	44	152—158°/ 192—202°	„	19	B
45	„ „	81					
46	„ „	65					
47	„ „	67	64	155—160°/ 200—202°	„	38	B
48	„ „	65					
49	„ „	70					
50	„ „	60	112	152—158°/ 192—202°	„	10	B
51	„ „	67					
52	„ „	70					
53	„ „	116	68	155—160°/ 200—202°	„	35	B
54	„ „	111					
55	„ „	79					
56	„ „	103	140	amorph, braun	„	26	amorph, gelb
57	„ „	105					
58	„ „	102					
59	„ „	111	17	amorph, gelb	„	13	amorph, gelb-braun
60	„ „	86					
61	„ „	85					
62	„ „	103	6	„ „	„	98	„ „
63	„ „	105					
64	„ (45:55)	70					
65	„ „	108	13	amorph, gelb-braun	Me-Ae	70	C
66	„ „	109					
67	„ „	108					
68	„ „	107	98	220—226°	„ „	139	C
69	„ „	108					
70	„ „	110					
71	„ „	175	98	220—226°	„ „	90	C
72	„ „	340					
73	„ (15:85)	190					
74	„ „	255	300	220—226°	„ „	29	C
75	„ (5:95)	170	580				
76	„ „	230	658				
77	„ „	115	43				

Trennung des Chloroform-Butanol-Extrakts. Die 3,926 g Chloroform-Butanol-Extrakt wurden an 120 g Al_2O_3 ¹⁾ chromatographisch in 32 Fraktionen zerlegt.

Die Fraktionen 1–13 (zusammen 0,4 g, eluiert mit Chloroform sowie Chloroform-Methanol-Gemischen bis zu 20% Methanolgehalt) gaben nur amorphes Material.

Die Fraktionen 14–25 (zusammen 1,64 g, eluiert mit Chloroform-Methanol-Gemischen von 20–50% Methanolgehalt) gaben aus Methanol-Aceton 377 mg rohen Stoff F in farblosen Kristallen, Smp. 196–202° (Reinigung siehe unten).

Die Fraktionen 26–32 (eluiert mit Chloroform-Methanol (1:1) und reinem Methanol) gaben zusammen noch 0,495 g amorphes Material (Al_2O_3 -haltig).

Etwa 1,031 g waren somit aus der Säule mit Methanol nicht eluierbar.

Reinigung von Stoff F²⁾. Die 0,377 g rohe Kristalle wurden zweimal aus Me-An umkristallisiert und gaben 300 mg fast aschefreies Produkt, Smp. 198–202°.

Die Gesamtausbeuten an krist. Stoffen aus 35 g trockenem Sekret betrugen: 56 mg (0,16%) krist. Steringemisch, 0,340 g (0,70%) Genin A, 0,116 g (0,33%) Genin B, 0,53 g (1,67%) Genin C, 2,047 g (6,60%) Genin D, 0,75 g (2,14%) Genin E und 0,377 g (1,07%) Stoff F. — Die analoge Trennung von weiteren 60 g Sekret gab ein ganz ähnliches Resultat.

Beschreibung und Identifizierung der isolierten Stoffe.

Genin A. Bufotalinin (I). Aus Methanol farblose Oktaeder, Smp. 195–201° (Sintern von 190° an), $[\alpha]_D^{26} = +19,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1897$ in Chloroform). Gewichtsverlust bei Trocknung 2,10% $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6 + \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (423,53). Ber. 2,13%.

$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$ (414,52) Ber. C 69,45 H 7,29% Gef. C 69,15 H 7,58% (OAB)

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (416,53) „ „ 69,21 „ 7,74%

Die Kristalle waren nach Papierchromatographie völlig einheitlich und identisch (vgl. Fig. 2 Theoret. Teil) mit der Hauptkomponente des Originalpräparats von *Wieland* u. Mitarb.³⁾ Diese Forscher beschrieben Bufotalinin als verhältnismässig zersetzliche Substanz vom Smp. 233° (Zers. ab 100°) und $[\alpha]_D = +14,1^\circ$ (in 80-proz. Äthanol) von der Bruttoformel $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$. Auch die Mischprobe beider Präparate gab keine Depression.

Bufotalininacetat (II). 71 mg Bufotalinin (Genin A) vom Smp. 195–202° wurden mit 0,7 cm³ abs. Pyridin und 0,7 cm³ Acetanhydrid 48 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 91 mg Rohprodukt. Aus Aceton 65 mg farblose Blättchen, Smp. 235–243° (Zers., Sintern ab 232°), $[\alpha]_D^{20} = +30,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,2692$ in Chloroform).

12,77 mg Subst. zu 1,00615 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{20} = +0,389^\circ \pm 0,02^\circ$

Gewichtsverlust bei Trocknung (3 Std.) = 8,3%.

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_7$ (456,51) Ber. C 68,40 H 7,06% Gef. C 68,79 H 7,36% (OAB)

$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (458,53) „ „ 68,10 „ 7,47%

Wieland u. Mitarb.³⁾ fanden für Bufotalininacetat Smp. 247° (Sintern ab 225°). Die Mischprobe mit Hellebrigeninacetat schmolz bei 215–225° (letzte Reste bis 234°).

Genin B. Telocinobufagin (III). Aus Methanol lange, farblose, zu Rosetten vereinigte Prismen mit Doppel-Smp. 150–154°/197–206°, $[\alpha]_D^{26} = +4,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,2384$ in Chloroform).

Gewichtsverlust bei Trocknung 4,16% $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5 + \text{H}_2\text{O}$ (420,53) Ber. 4,21%

$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$ (402,51) Ber. C 71,61 H 8,51 Gef. C 71,79 H 8,66% (OAB)

„ „ 71,52 „ 8,60% (A.P.)

Das Präparat war nach Papierchromatographie einheitlich und identisch mit authentischem Telocinobufagin^{c)}. Letzteres, sowie die Mischprobe schmolzen gleich, auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H_2SO_4 und SbCl_3 waren gleich.

¹⁾ In einem Vorversuch hatte sich gezeigt, dass Al_2O_3 ein besseres Resultat gibt als Mg-Silikat-Kieselgur.

²⁾ Es wäre wohl zweckmässiger gewesen, die rohe Subst. F (inkl. Mutterlaugen) zuerst durch Ausschütteln aus Chf-Alk-Gemisch mit verd. Säure und Na_2CO_3 von Al_2O_3 -Resten zu befreien.

Telocinobufaginacetat (IV). 53 mg Genin B vom Doppel-Smp. 150–154°/197–206° wurden in 0,6 cm³ abs. Pyridin und 0,6 cm³ Acetanhydrid 48 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 63 mg Rohprodukt. Aus Aceton 43 mg farblose kleine Prismen, Smp. 261–266° (Sintern ab 255°), $[\alpha]_D^{21} = +24,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1977$ in Chloroform).

Kein Gewichtsverlust bei Trocknung.

C₂₆H₃₆O₆ (444,55) Ber. C 70,24 H 8,16% Gef. C 69,37 H 8,16% (OAB)

Authentisches Telocinobufaginacetat und die Mischprobe schmolzen gleich, auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ und SbCl₃ waren gleich.

Genin C. Hellebrigenin = Bufotalidin (V). Aus Methanol-Äther farblose Prismen, entweder mit Doppel-Smp. 150°/220–227° oder nur Sintern bei 140–150° und Smp. 220–227°; $[\alpha]_D^{24} = +19,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,074$ in Chloroform) bzw. $[\alpha]_D^{27} = +19,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,112$ in Chloroform), $[\alpha]_D^{25} = +16,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,123$ in 80-proz. Äthanol). Kein Gewichtsverlust bei Trocknung.

C₂₄H₃₂O₆ (416,53) Ber. C 69,20 H 7,74%
Gef. „ 69,00; 68,96 „ 7,99; 8,04% (OAB)

Das UV.-Absorptionsspektrum zeigte ein breites Maximum bei 300 mμ, log ε = 3,75 (vgl. Fig. 6). Das Präparat war nach Papierchromatographie einheitlich und identisch (vgl. Fig. 3, Theoret. Teil) mit der Hauptkomponente des Originalpräparats von Bufotalidin von Wieland, Hesse & Hüttel³) sowie mit authentischem Hellebrigenin⁴). Auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ und SbCl₃ waren gleich.

Hellebrigeninacetat (VI). 48 mg Genin C vom Smp. 220–227° wurden in 0,5 cm³ abs. Pyridin und 0,5 cm³ Acetanhydrid 48 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 59 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 42 mg farblose, zu Drusen vereinigte Blättchen, Smp. 226–233° (Zers.); $[\alpha]_D^{23} = +36,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,098$ in Chloroform). Gewichtsverlust bei Trocknung 0,51%.

C₂₆H₃₄O₇ (458,53) Ber. C 68,10 H 7,47% Gef. C 68,40 H 7,79% (OAB)

Die Mischprobe mit authentischem Hellebrigeninacetat gab keine Depression. Auch die IR.-Spektren (in Chloroform) waren gleich (vgl. Fig. 4), ebenso die Laufstrecken im Papierchromatogramm und die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ und SbCl₃.

Genin D. Bufotalin (VII). Aus Aceton-Äther farblose Körner, Smp. 218–225° (Sintern ab 210°); $[\alpha]_D^{25} = +4,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,363$ in Chloroform).

C₂₆H₃₆O₆ (444,54) Ber. C 70,24 H 8,16% Gef. C 70,04 H 8,10% (OAB)

Das Präparat war nach Papierchromatographie einheitlich und identisch mit authentischem Bufotalin (VII). Letzteres sowie die Mischprobe schmolzen gleich, auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ und SbCl₃ waren gleich.

Bufotalinacetat (VIII). 47 mg Genin D vom Smp. 218–225° wurden mit 0,5 cm³ abs. Pyridin und 0,5 cm³ Acetanhydrid 48 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 60 mg Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 46 mg farblose, zu Drusen vereinigte Prismen, Smp. 257–261° (Sintern ab 245°); $[\alpha]_D^{27} = +4,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,062$ in Chloroform).

C₂₆H₃₆O₇ (486,60) Ber. C 69,11 H 7,87% Gef. C 68,87 H 7,82% (OAB)

Authentisches Bufotalinacetat und die Mischprobe schmolzen gleich.

Auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ und mit SbCl₃ waren gleich, wie folgt: 84-proz. H₂SO₄: blass orange gelb (0'), blass gelborange (1'), blass beige (weinroter Rand) (5'), braun (rotvioletter Rand) (1 Std.), weinrot (1½ Std.). SbCl₃ auf Papier: gelb → braunviolett (sichtbar), rotviolett (UV.).

Genin E. Marinobufagin (IX). Aus Aceton-Äther farblose Prismen, Smp. 212–220°; $[\alpha]_D^{26} = +10,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,109$ in Chloroform).

C₂₄H₃₂O₅ (400,49) Ber. C 71,97 H 8,05% Gef. C 72,11 H 8,18% (A.P.)

Das Präparat war nach Papierchromatographie einheitlich und identisch mit authentischem Marinobufagin (IX). Letzteres schmolz bei 220–224° (Sintern ab 212°),

die Mischprobe bei 214—222° (Sintern ab 212°). Die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ und SbCl₃ waren gleich.

Marinobufaginacetat (X). 48 mg Genin E vom Smp. 212—220° wurden mit 0,5 cm³ abs. Pyridin und 0,5 cm³ Acetanhydrid 48 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 62 mg Rohprodukt, aus Aceton-Äther farblose Prismen, Smp. 193—205° (letzte Reste bei 213°); $[\alpha]_D^{26} = +24,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,059$ in Chloroform).

Zur Analyse Trocknung 48 Std. bei 20°: 6,03% Gewichtsverlust.

C₂₆H₃₄O₈ (442,53) Ber. C 70,56 H 7,74% Gef. C 70,73 H 7,99% (OAB)

Authentisches Marinobufaginacetat und die Mischprobe schmolzen gleich.

Auch die Farbreaktionen mit 84-proz. H₂SO₄ und mit SbCl₃ waren gleich, wie folgt: 84-proz. H₂SO₄: orange (0'), orangerot (1'), orangebraun (5'), rotbraun (olivgrüner Rand (30'), olivbraun (grüner Rand) (1 Std.), dunkelgrün (1½ Std.). SbCl₃ auf Papier: orange → orangebraun (sichtbar), gelborange (UV.).

Stoff F. Bufotoxin (Vulgarobufotoxin) (XI). Aus Methanol-Aceton farblose Körner, Smp. 198—202°; $[\alpha]_D^{26} = +2,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,9939$ in Methanol).

Trocknung gab 2,62% Gewichtsverlust.

C₄₀H₆₀O₁₀N₄ (756,91) Ber. C 63,47 H 7,99 N 7,40%

Gef. „ 63,21 „ 7,87 „ 7,21%

Das UV.-Absorptionsspektrum in Alkohol zeigte ein Maximum bei 295 mμ, log ε = 3,74 (auf obige Formel berechnet). Smp., Drehung und Analysenzahlen stimmen sehr gut mit den von *Wieland* u. Mitarb.^{a) p)} für Bufotoxin gefundenen Werten überein.

Acetylierung. 45 mg Stoff F (Bufotoxin) vom Smp. 194—198° wurden in 0,5 cm³ abs. Pyridin und 0,5 cm³ Acetanhydrid 70 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung (mit Chloroform) gab 50 mg Rohprodukt, das bisher nicht kristallisierte.

Oxydation von Bufotalininacetat (II) mit CrO₃. 31 mg Bufotalininacetat vom Smp. 235—240° wurden in 2 cm³ reinstem Eisessig mit 0,1 cm³ 2-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung versetzt, die nach 30' bei 20° verbraucht war. Weitere 0,15 cm³ derselben Lösung waren nach 1½ Std. ebenfalls verbraucht. Daher wurden nochmals 0,1 cm³ (total 0,35 cm³ entspr. 7 mg CrO₃) zugegeben, die nach 5 Std. nicht mehr völlig verbraucht waren. Es wurde mit 1 Tropfen Methanol versetzt und 16 Std. bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung mit Chloroform gab 19 mg neutrale und 11 mg sodalösliche Anteile.

Die 19 mg Neutralkteile gaben aus Aceton-Äther 6 mg farblose, zu Drusen vereinigte Spiesse, Smp. 147—151°. Nach Umkristallisieren Doppel-Smp. 155—160°/182—192°; $[\alpha]_D^{25} = +40,1^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,602$ in Chf).

Gewichtsverlust bei Trocknung 4,4%.

C₂₆H₃₂O₇ (456,51) Ber. C 68,40 H 7,06% Gef. C 67,89 H 7,47% (OAB)

Die 11 mg sauren Anteile gaben aus Methanol-Äther 4,5 mg farblose Prismen, Smp. 235—240°. Nach Umkristallisieren Smp. 235—237° (Zers.); $[\alpha]_D^{25} = +40,2^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,49$ in Chf). Kein Gewichtsverlust bei Trocknung.

C₂₆H₃₂O₈ (472,51) Ber. C 66,08 H 6,83%

C₂₆H₃₄O₈ (474,53) „ „ 65,80 „ 7,22% Gef. C 65,69 H 7,06% (OAB)

Die Mischprobe mit Bufotalininacetat schmolz bei 222—230° (Zers., Sintern ab 214°).

In einem zweiten Versuch wurden 39 mg Bufotalininacetat analog oxydiert und gaben 24,5 mg neutrale und 15 mg saure Anteile.

Methylester. 8,7 mg der rohen Säure (Kristalle + zugehörige Mutterlauge) wurden in wenig Aceton mit ätherischer Diazomethanlösung bei 20° 10 Min. stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 8,4 mg neutrales Rohprodukt. Es wurde an Al₂O₃ chromatographiert, lieferte aber bisher keine Kristalle.

Die Mikroanalysen wurden teils im Mikrolabor des Instituts (Leitung *E. Thommen*) (OAB), teils bei Herrn *A. Peisker*, Brugg (*A. P.*) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Aus dem Parotis-Drüsensekret von *Bufo bufo bufo* L. liessen sich 6 krist. Lactone (A–F) isolieren. Fünf davon (A–E) waren Bufogenine, das sechste war identisch mit *Wieland's* Bufotoxin (= Vulgarobufotoxin). Die fünf Genine konnten mit den folgenden bekannten Stoffen identifiziert werden:

Genin A = Hauptkomponente des Bufotalinins von *Wieland* u. Mitarb., Genin B = Telocinobufagin, Genin C = Hellebrigenin = Bufotalidin, Genin D = Bufotalin, Genin E = Marinobufagin. – Ferner wurde festgestellt, dass ein Originalpräparat von Bufotalinin von *Wieland* u. Mitarb. kleine Mengen Hellebrigenin und Marinobufagin enthält. Ein Originalpräparat von Bufotalidin war fast reines Hellebrigenin, das eine kleine Menge Telocinobufagin enthält.

Hellebrigenin ist das erste herzaktive Genin, das sowohl aus pflanzlichem wie aus tierischem Material erhalten werden konnte.

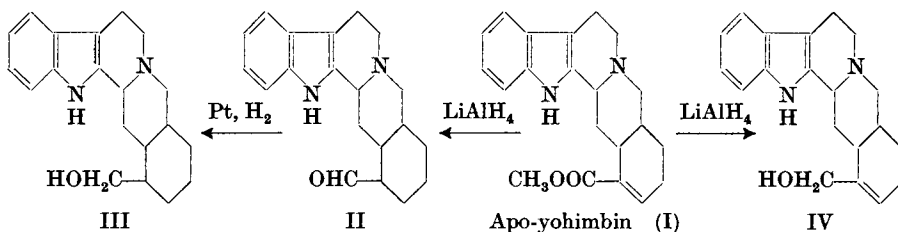
Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

100. Reduktion des Apo-yohimbins mittels Lithiumaluminiumhydrid

von J. Brüesch und P. Karrer.

(21. IV. 55.)

Durch Reduktion von Apo-yohimbin (I) mit Lithiumaluminiumhydrid war früher¹⁾ eine Substanz der Zusammensetzung $C_{20}H_{24}ON_2$ erhalten worden, die als „Apo-yohimbylalkohol“⁽¹⁾ bezeichnet worden ist. Eine erneute Untersuchung dieser Reaktion ergab, dass dabei mindestens zwei verschiedene Reduktionsprodukte der Formel $C_{20}H_{24}ON_2$ gebildet werden. Das eine ist – auch bei Verwendung eines Überschusses des Reduktionsmittels – ein Aldehyd, den wir Dihydro-apo-yohimbal nennen und der der Formel II entspricht; er



¹⁾ A. Chatterjee & P. Karrer, *Helv.* **33**, 808 (1950).