

## 172. Isolierung und Identifizierung der Steroide des Giftsekretes der Berberkröte (*Pantherkröte*) *Bufo mauretanicus L.*<sup>1)</sup><sup>2)</sup><sup>3)</sup>.

Über Krötengifte, 11. Mitteilung<sup>4)</sup>

von Rosmarie Bolliger und Kuno Meyer.

(14. V. 57.)

In den früheren Arbeiten dieser Reihe ist in erster Linie über die Isolierung und Konstitutionsaufklärung der Bufogenine (Bufadienolide<sup>5)</sup>) aus der chinesischen Krötengiftdroge Ch'an Su berichtet worden. Diese stellt eine wahre Fundgrube für solche Steroide dar<sup>4)</sup>. Da die Beschaffung dieser Droge aber noch mehrere Jahre nach dem Kriege erhebliche Schwierigkeiten bereitete, aber andererseits bekannt ist, dass die einzelnen Bufogenine für eine bestimmte Krötenspezies nur beschränkt spezifisch sind, hofften wir, im Giftsekret von leichter zugänglichen Krötenarten die uns besonders interessierenden Bufogenine des Ch'an Su ebenfalls aufzufinden.

Ausser der chinesischen Krötengiftdroge Ch'an Su ist vor allem das Giftsekret der europäischen Erdkröte (*Bufo bufo bufo L.*) sehr eingehend untersucht worden<sup>m)</sup><sup>6)</sup>. Neben dem in seiner chemischen Konstitution bereits aufgeklärten Hauptbufogenin Bufotalin enthält das Giftsekret der europäischen Kröte noch zwei weitere auch im Ch'an Su aufgefondene Bufogenine, nämlich das Telocinobufagin und das Hellebrigenin<sup>4)</sup>, doch sind diese beiden Herzgifte in ihrer Struktur bereits aufgeklärt. Es blieb somit nur noch als letztes verhältnismässig leicht zugängliches Krötengift dasjenige der Aga, der südamerikanischen Kröte *Bufo marinus*. Wie aber vor kurzem gezeigt wurde<sup>4)</sup>, enthält das Giftsekret dieser Krötenart praktisch bloss zwei Bufogenine, wovon nur das in seiner Struktur aufgeklärte Telocinobufagin ebenfalls im Ch'an Su enthalten ist. Wir wandten uns deshalb einer noch wenig untersuchten Krötenart zu, nämlich der nordafrikanischen Berberkröte, die wegen ihrer prächtigen Zeichnung auch Pantherkröte genannt und zoologisch als *Bufo mauretanicus L.* bezeichnet wird. Das

<sup>1)</sup> Auszug aus dem 1. Teil der Diss. *Rosmarie Bolliger*, Basel 1957.

<sup>2)</sup> Diese Untersuchung wurde schon vor einigen Jahren durchgeführt. Ihre Veröffentlichung ist äusserer Umstände wegen erst jetzt möglich.

<sup>3)</sup> Über die Ergebnisse dieser Arbeit ist an der 136. Jahresversammlung der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft in Basel (22. bis 24. Sept. 1956) kurz referiert worden.

<sup>4)</sup> 10. Mitt., *J. P. Ruckstuhl & K. Meyer*, *Helv.* **40**, 1270 (1957).

<sup>5)</sup> Zur Bezeichnung „Bufadienolid“ siehe „Vorschläge zur Nomenklatur der Steroide“, *Helv.* **34**, 1680 (1951).

<sup>6)</sup> Die mit Buchstaben bezeichneten Fussnoten siehe Seite 1664.

Gift dieser Kröte ist u. W. einzig von *Gessner*<sup>7)</sup>, und zwar in erster Linie pharmakologisch untersucht worden. Wohl hat *Gessner* auch den sogen. Digitaliskörper, d. h. das herzwirksame Prinzip in reiner Form zu isolieren versucht. Die von ihm in einer Menge von kaum 20 mg erhaltenen Kristalle zeigten Digitaliswirkung, wiesen aber einen sehr tiefen Smp. von etwa 114° auf und dürften demzufolge kaum einheitlich gewesen sein.

Für Vorversuche stand uns eine kleine Menge an trockenem Giftsekret zur Verfügung, das wir uns selbst durch Auspressen der „Parotiden“ (kompakte, längliche und warzenförmige Drüsengehäuse in der Ohrgegend) von 10 erwachsenen Exemplaren der Berberkröte gewonnen hatten<sup>8)</sup>. Durch Ausziehen mit Chloroform nach der Methode von *Tschesche & Offe*<sup>9)</sup> liess sich daraus in etwa 24-proz. Ausbeute ein brauner Extrakt gewinnen, der sämtliche chloroformlöslichen Steroide enthielt. Er wurde in Chloroform gelöst, durch Verteilen zwischen verd. HCl und verd. Sodalösung von Ballaststoffen befreit, die nahezu zwei Drittel ausmachten, so dass schliesslich nur eine sehr kleine Menge an vorgereinigtem Steroidgemisch zur Verfügung stand, das nur etwa 9% des Ausgangsmaterials ausmachte, ein Umstand also, der eine präparative Aufteilung in die einzelnen Bestandteile wenig aussichtsreich erscheinen liess. Wir versuchten deshalb, mit Hilfe der Papierchromatographie Einblick in die Zusammensetzung dieses vorgereinigten Extraktes zu gewinnen.

Nach einigen Tastversuchen, die wir mit einer Reihe von einheitlichen Bufogeninen vor allem aus Ch'an Su ausführten, erwiesen sich für die Aufteilung von Bufogenin-Gemischen vor allem zwei Systeme als besonders geeignet, die Modifikationen der von *Zaffaroni* und Mitarb.<sup>10)</sup> benützten Methode zur Analyse von Nebennierenrindenhormonen darstellen und in der Folge dann z. T. auch von *Reichstein* und Mitarb.<sup>11)</sup> für die Papierchromatographie der Bufogenine der europäischen Erdkröte mit Erfolg angewandt wurden. Es sind dies die beiden folgenden Systeme:

1. Ruhende Phase: Propylenglykol-Wasser 4:1; Bewegliche Phase: Benzol-Chloroform 1:1.
2. Ruhende Phase: Formamid; Bewegliche Phase: Benzol-Chloroform 6:4.

Durch Besprühen der Papierchromatogramme mit Antimontrichlorid-Lösung (näherte Angaben siehe Exper. Teil) liessen sich die gewanderten Substanzen sichtbar machen. Die dabei erzielten Flecken

<sup>7)</sup> *O. Gessner*, Sitzungsber. d. Gesellsch. z. Beförderung der gesamten Naturw., Marburg **61**, 138 (1926), bes. S. 169—192.

<sup>8)</sup> Wir danken Herrn Prof. Dr. *Edmond Sergent*, Direktor des Instituts Pasteur in Algier, herzlich für die Besorgung und Übersendung dieser Tiere.

<sup>9)</sup> *R. Tschesche & H. A. Offe*, Ber. deutsch. chem. Ges. **68**, 1998 (1935).

<sup>10)</sup> *A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann*, Science **111**, 6 (1950); *A. Zaffaroni & R. B. Burton*, J. biol. Chemistry **188**, 763 (1951).

sind z. T. verschieden gefärbt und zeigen ausserdem im ultravioletten Licht noch zusätzliche Fluoreszenzfarben, was für die Identifizierung der einzelnen Substanzen von ganz erheblichem Wert ist, weil dadurch neben den Rf-Werten noch weitere Kriterien für die Erkennung der einzelnen Bufogenine nutzbar gemacht werden können<sup>11).</sup>

Die RF-Werte einer grösseren Anzahl reiner Bufogenine in diesen beiden Systemen sind in Tab. 5 der 10. Mitt. dieser Reihe<sup>4)</sup> enthalten. Die dort angegebenen Zahlen sind Durchschnitts- und keine Absolut-Werte.

Daraus geht hervor, dass die beiden Bufogenine Bufotalin und Bufalin im System Propylenglykol-Wasser gleiche Rf-Werte zeigen,

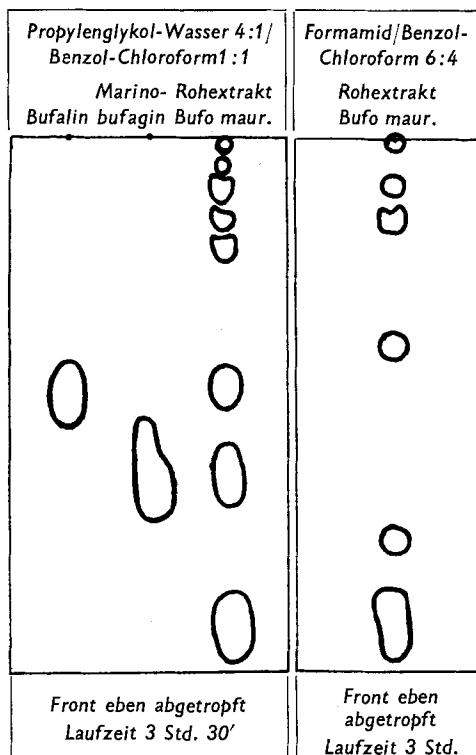


Fig. 1.

während im System mit Formamid diese Werte deutlich verschieden sind. Genau umgekehrt verhält sich das Paar Bufalin-Cinobufotalin, das nur im System Propylenglykol-Wasser getrennt werden kann. Das Paar Cinobufagin-Resibufogenin ist demgegenüber mit keinem der

<sup>11)</sup> Mit Antimontrichlorid geben allerdings nicht nur die Bufogenine Färbungen, sondern auch andere Substanzen.

beiden Systeme aufteilbar, doch lassen sich diese beiden Bufogenine mit Hilfe der klassischen Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  glatt trennen. Marinobufagin und Cinobufotalin weisen in den beiden benützten Systemen beinahe dieselben Rf-Werte auf. Ihre Färbungen mit Antimontrichlorid sind aber deutlich verschieden, so dass beim Vorliegen eines einzigen dieser Bufogenine eine sichere Identifizierung möglich ist.

Nachdem uns damit zwei brauchbare papierchromatographische Verfahren zur Aufteilung und Identifizierung von Bufogeninen zur Verfügung standen, haben wir diese für die Aufklärung des oben erwähnten vorgereinigten Giftextraktes benützt und erhielten dabei die in Fig. 1 wiedergegebenen Verteilungsbilder.

Es lassen sich, wie man sieht, vor allem drei Substanzen erkennen, die durch grössere Laufstrecken charakterisiert sind. Die durch Antimontrichlorid hervorgerufenen Färbungen im Tageslicht und unter der UV.-Lampe sowie die Wanderungsstrecken zeigen, dass zwei dieser Flecken durch Bufalin und Marinobufagin, die zum Vergleich auf einem dieser Papierchromatogramme als Reinsubstanzen mitaufgetragen worden waren, hervorgerufen sein müssen, während die grosse Laufstrecke und die Färbung des untersten Flecken für das Vorliegen von Resibufogenin spricht. Neben diesen drei Hauptbufogeninen enthält der Rohexakt noch eine Reihe weiterer, viel stärker polarer Substanzen, die, aus der Grösse der Flecken zu schliessen, nur einen relativ sehr geringen Anteil der drei Hauptgenine ausmachen.

Mit Hilfe einer etwas grösseren Menge Rohexakt<sup>12)</sup> (ca. 1 g) hofften wir, auch diese Stoffe identifizieren zu können. Wir nahmen damit zunächst eine chromatographische Aufteilung an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  vor und zerlegten das Gemisch nach dem Durchlaufverfahren in 28 Fraktionen, die alle im System Formamid/Benzol-Chloroform (6:4) papierchromatographisch untersucht wurden. Über das Ergebnis orientiert die Fig. 2.

Die ersten vier Fraktionen waren sehr leicht löslich in Pentan. Aus Methanol liessen sich leicht Kristalle gewinnen, die im Gemisch mit  $\gamma$ -Sitosterin keine Smp.-Depression<sup>13)</sup> zeigten und bei der Acetylierung die für dieses Sterin typische Acetylverbindung vom Smp. 133 bis 134° lieferten<sup>14)</sup>.

Die Fraktionen 5–21 waren amorph. Im Papierchromatogramm erwiesen sie sich als einheitlich, gaben bei der Acetylierung praktisch

<sup>12)</sup> Wir möchten auch an dieser Stelle der Pariser-Vertretung der *F. Hoffmann-La Roche AG.* und Herrn *Friedrich Celo*, Amphibienhandlung in Zweibrücken, bestens für ihre Hilfe bei der Beschaffung von rohem Giftsekret der Berberkröte danken.

<sup>13)</sup> Die Mischprobe vermag hier allerdings nichts über die Identität auszusagen, da  $\gamma$ -Sitosterin im Gemisch mit Cholesterin keine Depression gibt (vgl. <sup>c)</sup>).

<sup>14)</sup> Dieses Pflanzensterin ist zum ersten Male<sup>15)</sup> im Tierreich im Giftsekret der europäischen Erdkröte und später<sup>c)</sup> auch im chinesischen Krötengift Ch'an Su aufgefunden worden.

<sup>15)</sup> *R. Hüttel & H. Behringer*, Z. physiol. Chem. **245**, 175 (1937).

quantitativ eine gut kristallisierende Acetylverbindung, die in den beiden für Acetyl-resibufogenin (II) charakteristischen Kristallmodifikationen (feine, flache Nadelchen bzw. kompakte, gleichmässige Rhomben) erhalten werden konnte. Außerdem liess sich eine kristallisierte HCl-Verbindung gewinnen, die sich als identisch mit dem früher<sup>a)</sup> beschriebenen Resibufogenin-hydrochlorid (III) erwies<sup>16)</sup>. Damit ergibt sich, dass im Giftsekret der *B. mauretanicus* als Hauptbufogenin das amorphe, herzunwirksame Resibufogenin enthalten ist,

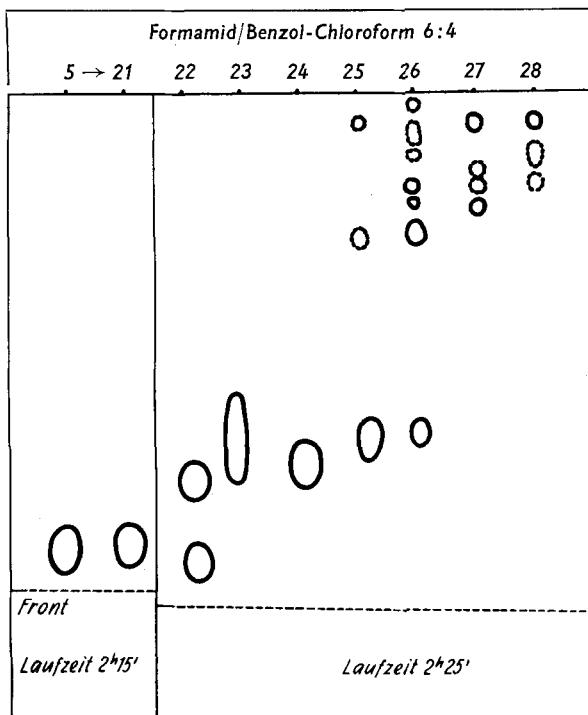
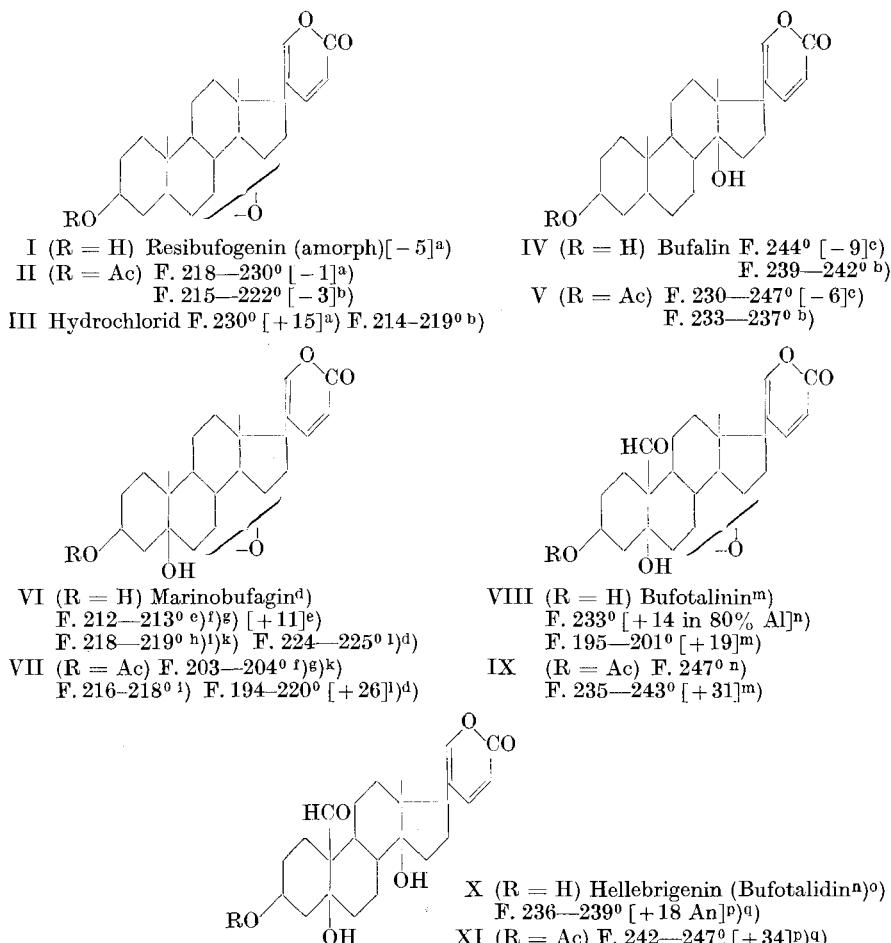


Fig. 2.

denn die Fraktionen 5–21 machen mengenmässig rund 65 % des gesamten eluierten Materials aus.

Aus den Fraktionen 22–24 konnten Kristalle gewonnen werden, die nach Smp., Mischprobe, Drehung, Farbreaktionen und papier-chromatographischem Verhalten identisch mit Bufalin (IV) waren.

<sup>16)</sup> Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Smp. der Acetylverbindung und des Hydrochlorids sind wesentlich tiefer als die früher für diese Substanzen publizierten. Da die hier gefundenen Daten jeweils durch Smp.-Bestimmungen von Testsubstanzen verifiziert wurden, sind die früheren diesbezüglichen Angaben, die vermutlich auf eine fehlerhafte Einstellung der *Kofler*-Apparatur zurückzuführen sind, hinfällig und durch Subtraktion von ca. 6° zu korrigieren.



Ac =  $\text{CH}_3\text{CO}-$ . Die Zahlen in eckigen Klammern geben die spez. Drehung für Na-Licht in den folgenden Lösungsmitteln an: ohne Bezeichnung = Chloroform, Al = Alkohol, An = Aceton.

a) K. Meyer, *Helv.* **35**, 2444 (1952).

b) Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

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

d) Hypothet. Teilformel nach *St. Pataki & K. Meyer*, *Helv.* **38**, 1631 (1955).

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

f) H. Jensen & K. K. Chen, *J. biol. Chemistry* **87**, 755 (1930).

g) H. Jensen & E. A. Evans jr., *J. biol. Chemistry* **104**, 307 (1934).

h) K. H. Slotta & K. Neisser, *Mem. Inst. Butantan (Sao Paulo)* **11**, 89 (1937).

i) V. Deulofeu & J. R. Mendoza, *Liebigs Ann. Chem.* **543**, 288 (1938).

k) V. Deulofeu, E. Duprat & R. Labriola, *Nature* **145**, 671 (1940).

l) K. Meyer, *Helv.* **34**, 2147 (1951).

m) Hypothet. Teilformel nach *H. R. Urscheler, Ch. Tamm & T. Reichstein*, *Helv.* **38**, 883 (1955).

n) H. Wieland, G. Hesse & R. Hüttel, *Liebigs Ann. Chem.* **524**, 203 (1936).

o) H. Wieland & G. Hesse, *Liebigs Ann. Chem.* **517**, 22 (1935).

p) J. Schmutz, *Pharmac. Acta Helv.* **22**, 373 (1947).

q) J. Schmutz, *Pharmac. Acta Helv.* **32**, 1442 (1949).

Auch die Eigenschaften der Acetylverbindung deckten sich mit denjenigen des Acetyl-bufalins (V)<sup>17)</sup>.

Die Mutterlaugen der Fraktionen 22–24 und die amorphe Fraktion 25 wurden vereinigt, acetyliert und an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Dabei konnten drei kristallisierte Acetyl-Verbindungen, nämlich Acetyl-resibufogenin (II), Acetyl-bufalin (V) und Acetyl-marinobufagin (VII) in reiner Form gewonnen werden. Letzteres dürfte zur Hauptsache oder sogar ausschliesslich aus Fraktion 25 stammen. Diese Fraktion gab nämlich im Papierchromatogramm (Formamid) einen sehr deutlichen Flecken mit einem Rf-Wert, der etwas kleiner war

als der des Bufalins, was typisch für Marinobufagin ist. Einen analogen Flecken zeigte auch das Papierchromatogramm der sehr uneinheitlichen Fraktion 26. Wir haben deshalb von letzterer nochmals ein Papierchromatogramm mit dem System Formamid/Benzol-Chloroform 6:4 angefertigt, wobei wir auf demselben Papierstreifen auch die beiden Bufogenine Marinobufagin und Bufotalinin mitlaufen liessen. Wie aus Fig. 3 ersichtlich ist, enthielt diese Fraktion zur Hauptsache die beiden Bufogenine Marinobufagin und Bufotalinin neben einer Reihe anderer, in viel geringerer Menge vorkommender Substanzen. Da keines dieser beiden Bufogenine in Kristallen gefasst werden konnte, versuchten wir durch Bereitung und Isolierung der krist. Acetylverbindungen obige Befunde noch zu erhärten. Das rohe Acetylierungsprodukt aus Fraktion 26 wurde an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert und liess sich dabei in zwei kristallisierte Substanzen aufteilen:

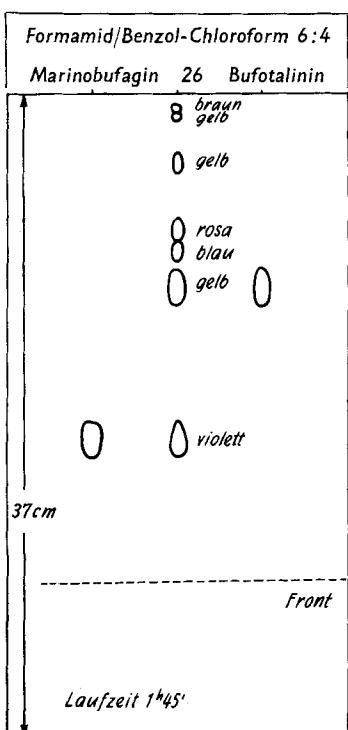


Fig. 3.

die erste erwies sich in bezug auf Smp., Mischprobe und Faroreaktionen (mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{SbCl}_3$ ) als identisch mit Acetyl-marinobufagin (VII), die zweite auf Grund derselben Kriterien als identisch mit Acetyl-bufotalinin (IX)<sup>18)</sup>. Auch im Papierchromato-

<sup>17)</sup> Dabei macht allerdings der Smp. des Acetyl-bufalins (V) aus *B. mauretanicus* eine Ausnahme, indem wir dafür hier den relativ eng begrenzten Wert 233–237° fanden, während V aus Ch'an Su im besten Fall zwischen 223–234° schmolz. Der früher angegebene Smp. 230–247° für V ist zu hoch (vgl. <sup>16)</sup>).

<sup>18)</sup> Wir danken Herrn Prof. T. Reichstein bestens für die Überlassung von reinen Proben Bufotalinin und Acetyl-bufotalinin.

gramm<sup>19)</sup> zeigten diese Acetylverbindungen völlige Übereinstimmung mit den entsprechenden Derivaten von Marinobufagin und Bufotalinin.

Aus den vereinigten Fraktionen 27 und 28 liess sich eine geringe Menge Kristalle gewinnen, die unscharf bei ca. 200° schmolzen. Im Papierchromatogramm zeigten sie Rf-Werte und Färbungen mit Antimontrichlorid, die genau denjenigen des Hellebrigenins (X) entsprachen. Nach Acetylierung liessen sich relativ leicht Kristalle gewinnen, die sich in allen Punkten als identisch mit Acetyl-hellebrigenin (XI) erwiesen. Besonders die tiefrosa bis permanganatfarbene Färbung mit konzentrierter Schwefelsäure, die nur wenige Sekunden bestehen bleibt und auffallenderweise weder vom freien Hellebrigenin noch mit 84-proz. Schwefelsäure gegeben wird, stellt einen sehr strikten Beweis für das Vorliegen von Acetyl-hellebrigenin dar. Auch im Papierchromatogramm zeigte die aus Fraktionen 27 und 28 gewonnene Acetylverbindung im Vergleich mit authentischem Acetyl-hellebrigenin absolute Übereinstimmung der Rf-Werte und der Färbungen mit Antimontrichlorid.

Im Parotissekret von *Bufo mauretanicus* konnten somit eindeutig neben dem Phytosterin  $\gamma$ -Sitosterin die 5 Bufogenine Resibufogenin, Bufalin, Marinobufagin, Bufotalinin und Hellebrigenin nachgewiesen werden. Die ungefähren Ausbeuten an den einzelnen Bufogeninen – bezogen auf das getrocknete Parotissekret – sind in folgender Zusammenstellung in % aufgeführt, wobei die Werte für die 3 zuletzt genannten nur als Schätzungen zu gelten haben:

Resibufogenin . . . . .	11	Bufotalinin . . . . .	0,1
Bufalin . . . . .	2	Hellebrigenin . . . . .	0,1
Marinobufagin . . . . .	0,3		

### Experimenteller Teil.

Alle Smp. wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze bis 250° etwa  $\pm 2^\circ$ .

**Papierchromatographie:** Verwendetes Papier: *Whatman* Nr. 1, in Streifen von 47 cm Länge und 10 cm (für 3 Substanzen) bzw. 14 cm (für 5 Substanzen) Breite geschnitten. Ca. 10 cm vom oberen Rand wurden mit Bleistift die Startlinie und auf dieser die Startpunkte in einem gegenseitigen Abstand von 2,5 cm angebracht. Verwendete Systeme: 1. Formamid<sup>20)</sup>/Benzol-Chloroform 6:4; 2. Propylenglykol-Wasser 4:1/Benzol-Chloroform 1:1<sup>21)</sup>. Die Imprägnierung der markierten Streifen erfolgte durch einmaliges langsames Durchziehen durch ein Gemisch von 7 Teilen Aceton und 3 Teilen stationärer Phase und anschliessende Trocknung durch senkrechtes Hängenlassen (Startlinie oben) an der Luft während 15 Min. Mit Hilfe von fein ausgezogenen Glaskapillaren oder Mikropipetten wurden 50—200  $\gamma$  Substanz, in wenig Methanol oder Aceton gelöst, auf die Startpunkte aufgetragen. Alle Chromatogramme wurden absteigend ausgeführt. Die Glaskammern wurden in einem temperaturregulierten Raum auf 20°  $\pm 1^\circ$  gehalten. Die Sätti-

<sup>19)</sup> Über die Papierchromatographie der Acetyl-bufogenine wurde in der 10. Mitt. dieser Reihe berichtet.

<sup>20)</sup> Wir benützten direkt „Formamid puriss. z. A. Kp.<sub>0,1</sub> 77—78°“ der Firma *Fluka AG.* in Buchs.

<sup>21)</sup> Die einzelnen Phasen der erwähnten Systeme waren vor der Verwendung durch kräftiges Schütteln und anschliessende Schichtentrennung gegenseitig gesättigt worden.

gung der Kammern erfolgte durch Einhängen eines Filtrierpapierstreifens, der mit den jeweils benützten Lösungsmitteln getränkt worden war. Die Laufzeit betrug im allgemeinen etwa 3 Std. Die Trocknung der fertigen Chromatogramme erfolgte in der Weise, dass die Papierstreifen horizontal in einem Rahmen fixiert, 1 Std. im Trockenkasten bei 60° und hierauf 1 Std. im Vakuumtrockenkasten auf 120° gehalten wurden, wobei beim letzteren von der gegenüberliegenden Seite des Abzughahns her vorsichtig Luft einströmen gelassen wurde. Dadurch erzielt man eine relativ rasche und gründliche Trocknung<sup>22)</sup>. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte durch Besprühen mit einer 20-proz. Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform und anschliessendes Erhitzen der Papierstreifen im Wärmekasten auf 80° während 5–10 Min. Die Abgrenzungen der Flecken wurden sofort mit Bleistift markiert und die im Tageslicht und unter der UV.-Lampe erhaltenen Farben notiert, da diese bald verblassen und einheitlich in helles Graublau bzw. Graubraun übergehen.

**Gewinnung des Giftsekretes:** Für die eigene Giftgewinnung standen uns 10 ausgewachsene Berberkröten zur Verfügung<sup>8)</sup>. Die Tiere wurden mit der linken Hand kräftig um den Leib gefasst und in hockender Stellung auf ein Brett gedrückt, das von einer Glasplatte (siehe Fig. 4) überdeckt war. Mit Hilfe einer Pinzette oder noch besser

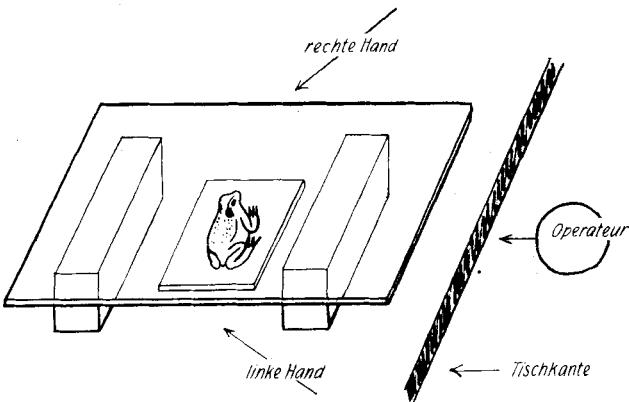


Fig. 4.  
Seitenansicht der Giftgewinnung.

mit Zeigefinger und Daumen wurden die länglichen, etwas hervorstehenden Drüsenpakete in der Ohrgegend möglichst tief gefasst und kräftig gepresst, wodurch das Sekret an das Glas spritzte. Durch Verschieben des Tieres auf der Unterlage während des „Melkens“ liess sich das ausgepresste Sekret gleichmässiger auf der Glasplatte verteilen. Die mit Giftsekret chargierten Platten wurden (Gift nach oben) in horizontaler Lage an einem vor direktem Sonnenlicht geschützten, trockenen Ort aufbewahrt, bis das Sekret trocken war. Das Trockensekret sprang in lackartigen Schuppen vom Glas ab oder konnte leicht abgeschabt werden. (Werden die Glasplatten vor der Verwendung mit einer hauchdünnen Schicht Vaselin- oder Siliconöl eingestrichen, so löst sich das trockene Gift spielend leicht von der Unterlage.) Die Trocknung des Giftes soll möglichst langsam sich vollziehen, damit die Bufotoxine durch die im Sekret enthaltenen Enzyme möglichst vollständig in die freien Bufogenine gespalten werden. Das in frischem Zustand nach faulendem Kohl stinkende Sekret ist nach dem Trocknen beinahe geruchlos. Wir fanden, dass sich noch eine ganz respektable Menge Giftsekret gewinnen lässt, wenn man nach erfolgter

<sup>22)</sup> Wenn die mit Formamid imprägnierten Streifen nicht völlig trocken sind, lassen sich mit  $SbCl_3$  keine Farbflecken hervorrufen. Wird während des Trocknens nicht ständig ein Luftstrom durchgeleitet, so schlägt sich Formamid vor allem an den kühleren Teilen des Kastens nieder und ist dann auch bei stundenlangem Evakuieren kaum wegzubringen.

erster Giftgewinnung kurz darauf (ca. 30—40 Min.) eine zweite vornimmt. Dann scheinen die Giftorgane völlig leer zu sein, denn wir konnten erst wieder nach 4—6 Wochen nennenswerte Mengen „abmelken“.

**Vorversuch:** Wir erhielten von den 10 eingesetzten Tieren total 1,899 g trockenes Sekret, das mit etwa dem gleichen Volumen reinem Seesand gemischt, im Mörser fein verrieben und mit Chloroform befeuchtet in der Extraktionshülse im Soxhlet 24 Std. mit Chloroform extrahiert wurde. Nach Verjagen des Chloroforms verblieben 0,457 g Rohextrakt (23,9%) als brauner Schaum. Dieser wurde in Chloroform gelöst und mit verd. HCl und verd. Sodalösung von basischen bzw. sauren Bestandteilen befreit. Die mit Wasser gewaschene Chloroformlösung wurde nach dem Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum eingedampft und ergab 167 mg neutralen Rückstand (Schaum), entspr. 8,8% des eingesetzten Trockengiftes.

Der so vorgereinigte neutrale Giftextrakt wurde über 5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nach dem Durchlaufverfahren chromatographiert und in 12 Fraktionen aufgeteilt. Mit Ausnahme einer einzigen Fraktion, die ca. 4 mg kristallisiertes Bufalin (Smp. 234—240°) gab, blieben alle Fraktionen amorph. Papierchromatographisch liessen sich darin mit Sicherheit Resibufogenin, Bufalin und Marinobufagin nachweisen. Die Papierchromatogramme wiesen daneben noch eine Reihe anderer Flecken auf, die aber nicht mit Sicherheit einem bestimmten Bufogenin zugeschrieben werden konnten. Nach Acetylierung der ersten amorphen Fraktionen konnte Acetyl-resibufogenin (II) in Kristallen gewonnen werden.

**Tabelle 1.**

Aufteilung von 985 mg vorgereinigtem Extrakt an  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Frak-tions-Nr.	Eluierungsmittel	Menge in mg	Ergebnisse der Papier-chromatographie	Habitus, bei Krist. Smp.
1—4	Petroläther-Benzol (1:4)	58	—	feine Nadelchen (Aceton), 146—149°, $\gamma$ -Sitosterin
5	Petroläther-Benzol (1:4)	20	Resibufogenin	amorph
6—7	Benzol	128	Resibufogenin	amorph
8—10	Benzol-Chloroform (19:1)	102	Resibufogenin	amorph
11—13	Benzol-Chloroform (9:1)	106	Resibufogenin	amorph
14—16	Benzol-Chloroform (4:1)	46	Resibufogenin	amorph
17—19	Benzol-Chloroform (3:2)	68	Resibufogenin	amorph
20—21	Benzol-Chloroform (3:7)	67	Resibufogenin	amorph
22	Benzol-Chloroform (3:7)	30	Resibufogenin + Bufalin	Prismen (Aceton-Äther)
23	Chloroform	85	Bufalin + Marinobufagin (?)	Bufalin 239—242°
24	Chloroform	28	Bufalin + Marinobufagin (?)	
25	Chloroform	20	Marinobufagin	amorph
26	Chloroform-Methanol (99:1)	67	Marinobufagin + Bufotalinin	amorph
27	Chloroform-Methanol (99:1)	27	Hellebrigenin	ca. 200°
28	Chloroform-Methanol (49:1)	12		
	Total	864		

**Hauptversuch:** 6,155 g Trockensekret wurden analog wie im Vorversuch im Soxhlet extrahiert und gaben total 1286 mg Rohextrakt (Schaum). Die Hauptmenge der chloroformlöslichen Bestandteile — nämlich 1050 mg — war schon im Laufe von 2 Std.

extrahiert. Der Rohextrakt wurde direkt über 20 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  filtriert, wobei 985 mg hellgelb-braun gefärbtes Material (als Schaum) resultierte, das in üblicher Weise an 30 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nach dem Durchlaufverfahren in 30 Fraktionen aufgeteilt wurde (siehe Tab. 1).

a)  $\gamma$ -Sitosterin. Die Fraktionen 1–5 gaben aus Methanol feine Nadelchen (sehr gut löslich in Äther und Pentan), nach einmaligem Umkristallisieren Smp. 146–149°. Sie zeigten im Gemisch mit  $\gamma$ -Sitosterin vom Smp. 148–150° keine Depression. Die durch Acetylierung in Pyridin-Acetanhydrid gewonnene Acetylverbindung kristallisierte aus Aceton-Äther in dünnen, seidenglänzenden Blättchen vom Smp. 132–134° und zeigte mit authentischem Acetyl- $\gamma$ -sitosterin keine Depression.

b) Resibufogenin (I). Die Mutterlauge der Frakt. 5 und die Fraktionen 6–21, die alle amorph waren, gaben im System Formamid-Benzol-Chloroform 6:4 einen einzigen Flecken, bedingt durch Resibufogenin (I), das als sehr wenig polare Substanz eine Wanderungsgeschwindigkeit aufweist, die beinahe derjenigen der Lösungsmittelfront entspricht. Der Mutterlaugenrückstand von Fraktion 5 und die Fraktionen 6–21 wurden vereinigt (ca. 500 mg) und für die folgenden Umsetzungen eingesetzt.

1. Acetyl-resibufogenin (II). 200 mg wurden in Pyridin-Acetanhydrid durch Stehenlassen während 24 Std. bei 20° acetyliert. Aus Aceton-Äther 180 mg flache, lange Nadelchen oder dicke, rhombische Plättchen, Smp. 215–222°;  $[\alpha]_D^{20} = -3,45^\circ$  ( $c = 2,325$  in Chloroform). Die Färbungen mit konz. Schwefelsäure waren genau gleich wie diejenigen mit authentischem Acetyl-resibufogenin aus Ch'an Su.

2. Resibufogenin-hydrochlorid (III). 100 mg wurden mit 5 cm<sup>3</sup> Chloroform, das bei Zimmertemperatur mit trockenem HCl-Gas gesättigt worden war (10,3 mg HCl/cm<sup>3</sup>), versetzt und 24 Std. in dicht verschlossenem Gefäß stehengelassen. Hierauf wurde mit 20 cm<sup>3</sup> Chloroform versetzt und rasch mit wenig Sodalösung und Wasser ausgeschüttelt. Die neutral gewaschene Chloroformlösung wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum verdampft. Der Rückstand gab aus Aceton-Äther farblose Blättchen vom Smp. 208–218°. Beilstein-Probe positiv. Eine Probe dieses Hydrochlorids wurde wie früher <sup>a)</sup> an Mg-Silikat chromatographiert. Smp. 214–219°. Misch-Smp. mit authentischem Resibufogenin-hydrochlorid vom Smp. 217–222°: 215–221°.

c) Bufalin (IV). Die Fraktionen 22–24 gaben, in einer Spur Aceton gelöst, auf Zusatz von Äther Kristalle, die zwischen 230–238° schmolzen. Die Kristalle wurden vereinigt und zweimal aus Aceton-Äther umkristallisiert. Smp. 239–242° (Sint. ab ca. 227°). Misch-Smp. mit authentischem Bufalin vom Smp. 240–242° (Sintern ab 235°): 238–241° (Sint. ab 230°). Die Farbreaktionen mit konz. Schwefelsäure und  $\text{SbCl}_3$  waren identisch mit denjenigen des Bufalins. — Die in üblicher Weise bereitete Acetylverbindung schmolz bei 233–237°. Authentisches, durch Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gereinigtes Acetyl-bufalin vom Smp. 222–232° gab bei der Mischprobe keine Depression (224–234°).

d) Acetyl-resibufogenin (II), Acetyl-bufalin (V) und Acetyl-marinobufagin (VII). Die Mutterlauen der Fraktionen 22–24 und die amorphe Fraktion 25 wurden vereinigt, in Pyridin-Acetanhydrid acetyliert (erhalten ca. 70 mg) und an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Petroläther-Benzol (1:1) und (1:3) eluierten 20 mg Material. Aus Äther feine Kristallnadelchen vom Smp. 212–218° (Acetyl-resibufogenin (II)). Benzol, Benzol-Chloroform (19:1), (9:1) und (4:1) eluierten 22 mg Substanz. Aus Äther feine Prismen vom Smp. 226–236° (Acetyl-bufalin (V)). Die Eluate mit Benzol-Chloroform (3:2) und (3:7) gaben rund 14 mg, die aus einer Spur Aceton auf Zusatz von Äther kristallisierten; Smp. 198–213°, Misch-Smp. mit Acetyl-marinobufagin (VII) (Smp. 196–216°) ebenso. Die Farbreaktionen mit konz. Schwefelsäure und  $\text{SbCl}_3$  waren genau gleich wie diejenigen von authentischem Acetyl-marinobufagin. Auch im papierchromatographischen Verhalten<sup>18)</sup> bestand völlige Übereinstimmung mit authentischem Acetyl-marinobufagin.

e) Acetyl-marinobufagin (VII) und Acetyl-bufotalinin (IX). Da die Fraktion 26, die auf Grund der Papierchromatographie (Fig. 3) vor allem Marinobufagin und Bufotalinin enthielt, nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte, wurde sie in üblicher Weise acetyliert und das rohe Gemisch der Acetylverbindungen an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Das mit Benzol-Chloroform (4:1) und der ersten Fraktion (3:2) eluierte

Material gab aus einer Spur Aceton auf Zusatz einiger Tropfen Äther eine kleine Menge Kristalle (rhombische Prismen), die zwischen 200 und 222° schmolzen = Acetyl-marino-bufagin (VII). Die mit Benzol-Chloroform (3:2) und reinem Chloroform eluierte Substanz liess sich ebenfalls aus einer Spur Aceton auf Zusatz einiger Tropfen Äther zur Kristallisation bringen. Smp. 232—244° (Zers.); Misch-Smp. mit authentischem Acetyl-bufotalinin (IX) vom Smp. 235—243° (Zers.) ohne Depression. Die Färbungen mit konz. Schwefelsäure und  $\text{SbCl}_3$  sowie das papierchromatographische Verhalten<sup>19)</sup> zeigten völlige Übereinstimmung mit authentischem Acetyl-bufotalinin.

f) Acetyl-hellebrigenin (XI). Aus den vereinigten Fraktionen 27 und 28 konnte aus wenig Aceton auf Zusatz von Äther eine geringe Menge Kristalle isoliert werden; Smp. sehr unscharf bei ca. 200°. Im Papierchromatogramm (Formamid/Benzol-Chloroform) gaben sie praktisch nur einen Flecken, dessen Rf-Wert ca. 0,06 betrug. Mit Antimontrichlorid färbte dieser sich gelb-grün. Authentisches Hellebrigenin zeigte im Vergleich denselben Rf-Wert und die nämliche Färbung mit  $\text{SbCl}_3$ . Kristalle und Mutterlauge der Fraktionen 27 und 28 wurden vereinigt und acetyliert. Das rohe Acetat wurde an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert und gab drusige Kristalle, die bei 228—237° (Zers.) schmolzen. Sie zeigten mit authentischem Acetyl-hellebrigenin (XI) vom Smp. 218—247° (Zers.) (papierchromatographisch einheitlich) den Misch-Smp. 220—244° (Zers.). — Sehr typisch für Acetyl-hellebrigenin ist seine Färbung mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : werden einige Kristalle auf konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  aufgestreut, so nehmen diese ganz kurze Zeit (einige Sek.) eine intensive Rosa- bis Permanganat-Färbung an. Hellebrigenin selbst zeigt dieses Verhalten nicht. Mit 84-proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gibt auch Acetyl-hellebrigenin nur eine Gelbfärbung. Das aus B. mauretanicus gewonnene Acetyl-hellebrigenin zeigte nun dasselbe Verhalten gegenüber konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wie das authentische Acetyl-hellebrigenin und gibt auch mit Antimontrichlorid dieselben Färbungen. Auch im Papierchromatogramm<sup>19)</sup> liess sich völlige Übereinstimmung feststellen.

### Zusammenfassung.

Im Giftsekret der Berberkröte, das durch Auspressen der Parotiden von *Bufo mauretanicus L.* gewonnen worden war, liessen sich sowohl mit Hilfe der Papierchromatographie wie auch auf präparativem Wege eindeutig die folgenden Bufogenine nachweisen: Resibufo- genin, Bufalin, Marinobufagin, Bufotalinin und Hellebrigenin. Die papierchromatographischen Ergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, dass ausser den genannten noch andere Bufogenine im Giftsekret von *B. mauretanicus* enthalten sind. Das Hauptbufogenin dieser Krötenart ist das herzinaktive Resibufo- genin.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

## 173. 2-Methyl- und 2,4-Dimethyl-dihydro-nicotinsäureester

von H. Kühnis, L. Kuss und P. Karrer.

(14. V. 57.)

Vor kurzem wurden von *K. Tsuda et al.*<sup>1)</sup> zwei neue, einfache Dihydro-pyridin-Abkömmlinge beschrieben, die sie aus  $\beta$ -Amino- crotonsäure-äthylester und Acrolein bzw. Crotonaldehyd erhielten. Sie geben ihnen (ohne Beweis) die Konstitution des 2-Methyl-1,4-

<sup>1)</sup> *K. Tsuda, Y. Satoh, N. Ikekawa & H. Mishima, J. org. Chemistry* **21**, 800 (1956).