

143. Isolierung und Aufteilung der chloroformlöslichen Bestandteile der chinesischen Krötengiftdroge Ch'an Su¹⁾.

Über Krötengifte, 10. Mitteilung²⁾

von Jean-Pierre Ruckstuhl und Kuno Meyer.

Herrn Prof. Dr. T. Reichstein zum 60. Geburtstag gewidmet.

(29. V. 57.)

In der ersten Mitteilung³⁾ dieser Reihe war über eine eingehendere chemische Untersuchung der chinesischen Krötengiftdroge Ch'an Su berichtet worden, wobei allerdings nicht die Originaldroge, sondern ein daraus nach *Tschesche*⁴⁾ bereiteter Rohextrakt zur Verfügung stand, der, um stark braun gefärbte Bestandteile zu entfernen, in einem Chloroform-Benzol-Gemisch⁵⁾ über eine Säule von Aluminiumoxyd filtriert worden war. Es war zu vermuten, dass dabei stark polare Substanzen grösstenteils auf der Säule verblieben und somit nicht mehr im Untersuchungsmaterial enthalten waren. Immerhin konnte dann mit Hilfe der chromatographischen Absorptionsanalyse an Al_2O_3 eine ganze Reihe von Substanzen in reiner Form gewonnen werden, nämlich (Reihenfolge entsprechend der Eluierungsfolge im präparativen Chromatogramm): das Sterin γ -Sitosterin, die Bufogenine Cinobufagin (IV), Bufalin (VI), Bufotalin (IX)^{5a)}, Cinobufotalin (XII), Gamabufotalin (XIV)^{5a)} und Telocinobufagin (XVI). In einer späteren Mitteilung⁶⁾ wurde noch über die Isolierung von Resibufogenin (I) ausführlich berichtet, das in obiger Reihenfolge zwischen γ -Sitosterin und Cinobufagin unterzubringen ist. Es konnten somit 7 einheitliche Stoffe aus dem erwähnten Ch'an-Su-Extrakt gewonnen werden, die grösstenteils schon von früheren Bearbeitern beschrieben worden waren. Während Bufalin⁷⁾, Bufotalin⁸⁾, Gamabufotalin⁹⁾ und Telocinobufagin¹⁰⁾ in der Folge dann in ihrer chemischen Konstitution restlos aufgeklärt werden konnten, bereiteten die mit den übrigen Bufogeninen unternommenen Abbauversuche Schwierigkeiten und machten grössere Mengen an Ausgangsmaterial nötig. Wir waren deshalb bestrebt, in den Besitz von Original-Ch'an Su zu kommen, um daraus einerseits wieder Ausgangsmaterial für unsere Abbau-

¹⁾ Auszug aus dem 1. Teil der Diss. Jean-Pierre Ruckstuhl, Basel 1957.

²⁾ 9. Mitt., St. Pataki & K. Meyer, Helv. **38**, 1631 (1955).

³⁾ K. Meyer, Pharmac. Acta Helv. **24**, 222 (1949).

⁴⁾ R. Tschesche & H. A. Offe, Ber. deutsch. chem. Ges. **68**, 1998 (1935).

⁵⁾ Nähere Angaben fehlten.

^{5a)} In reiner Form nur als Acetat isoliert.

⁶⁾ K. Meyer, Helv. **35**, 2444 (1952).

⁸⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1993 (1949).

⁷⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1238 (1949).

⁹⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1599 (1949).

¹⁰⁾ K. Meyer, Helv. **32**, 1593 (1949).

versuche zu gewinnen und um damit andererseits die Möglichkeit zu bekommen, darin auch noch nach neuen Bufogeninen zu suchen.

Durch die freundliche Hilfe von Herrn Prof. Dr. *Paul Huber*¹¹⁾ von der Universität Basel, der 1953 für kurze Zeit Japan besuchte, kamen wir in den Besitz eines Musters von Ch'an Su, das sich bei einer orientierenden chemischen Untersuchung als vollwertig erwies. In der Folge hatte dann Herr Prof. Dr. *Naoto Kameyama*¹¹⁾ am Scientific Research Institute in Tokio die Liebenswürdigkeit, uns von demselben Material eine grössere Menge beschaffen zu lassen, so dass wir damit in die Lage versetzt wurden, eine eingehende chemische Untersuchung von Original-Ch'an Su durchzuführen.

Zunächst waren wir bestrebt, mit Hilfe der Papierchromatographie Einblick in die Zusammensetzung des Ch'an Su in bezug auf die Bufogenine zu gewinnen. Wir benützten hierzu die beiden von *Bolliger & Meyer*^{11a)} zum Nachweis und zur Identifizierung dieser Steroide angegebenen Systeme, die in Kombination mit einer Vorchromatographie an Al_2O_3 bei gegenseitiger Kontrolle, soweit wir bis jetzt feststellen konnten, ein sicheres Erkennen der im Ch'an Su vorkommenden Bufogenine erlaubt. Wir haben das eine von *Bolliger & Meyer* angegebene Verfahren noch so modifiziert, dass auch Acetyl-bufogenine papierchromatographisch differenziert werden können. In der vorliegenden Arbeit kamen somit die folgenden Systeme zur Anwendung:

	ruhende Phase	bewegliche Phase
Bufogenine und stark polare Acetyl-bufogenine	Formamid Propylenglykol-Wasser 4:1	Benzol-Chloroform 6:4 Benzol-Chloroform 1:1
schwach polare Acetyl-bufogenine	Propylenglykol-Wasser 4:1	Petroläther-Benzol 1:1

Um reproduzierbare Resultate zu erhalten, wurden alle papierchromatographischen Versuche in einem auf $20^\circ \pm 1^\circ$ einregulierten Raum ausgeführt. Die Mengen der aufgetragenen Substanzen bewegten sich zwischen 20 und 200 γ . Grössere Mengen verursachen die Bildung länglicher Flecken oder solcher mit Schwänzen¹²⁾.

¹¹⁾ Wir möchten auch an dieser Stelle den Genannten unseren besten Dank für ihre tatkräftige Hilfe aussprechen.

^{11a)} Siehe die 11. Mitteilung dieser Reihe, *Helv.* **40** (1957), im Druck.

¹²⁾ Wir hatten uns methanolische Lösungen der verschiedenen Bufogenine von ganz bestimmtem Gehalt als Testlösungen angefertigt. Es zeigte sich nun, dass diese auf die Dauer nicht stabil sind, denn nach 2–4 Monaten gaben solche Lösungen im Papierchromatogramm 2 und mehr Flecken. Diese im Laufe der Zeit sich bildenden Umwandlungsprodukte konnten beim Cinobufagin (IV) und Bufotalin (IX) als Desacetylcinobufagin (III) bzw. Desacetyl-bufotalin (VIII) identifiziert werden. Methanol bewirkt somit eine Verseifung bzw. Umesterung der Acetoxy-Gruppen. Da aber Telocinobufagin (XVI) und Hellebrigenin (XVIII) im Methanol teilweise ebenfalls eine Umwandlung erfahren, muss angenommen werden, dass auch der Lactonring mit Methanol reagiert. Aber auch die Lösungen der Bufogenine in Aceton erwiesen sich als instabil. Hier kann eine direkte Einwirkung des Lösungsmittels wohl mit Sicherheit ausgeschlossen werden; die Zersetzungen dürften hier durch den Luftsauerstoff und das Licht bedingt sein. Es empfiehlt sich somit, die Testlösungen jeweils frisch zu bereiten oder doch nur kürzere Zeit aufzubewahren.

Für die Sichtbarmachung der Substanzen im Papierchromatogramm haben wir wie früher¹³⁾ Antimontrichlorid verwendet. Dieses eignet sich analog wie die konz. Schwefelsäure (siehe Tab. 3 und 4) auch zur färberischen Charakterisierung der Bufogenine selbst. In der Tab. 1 sind die Färbungen von 13 reinen Bufogeninen mit SbCl_3 wiedergegeben. Es wurde dabei wie folgt verfahren: die frisch in Methanol oder Aceton gelösten Bufogenine wurden so auf *Whatman*-Papier Nr. 1 aufgetragen, dass der Durchmesser der kreisrunden Flecken 20 mm ausmachte. Die jeweils aufgetragene Menge betrug 50 γ , 25 γ und 100 γ geben nur unwesentliche Farbunterschiede, während grössere oder kleinere Mengen stärkere Farbabweichungen aufweisen. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels wurden die Papiere in üblicher Weise mit SbCl_3 -Lösung besprüht und in der Wärme bei 80° während 5 Minuten entwickelt. Die Farben sind etwa 10 Minuten nach Entnahme der Papiere aus dem Trockenkasten am schönsten ausgebildet, verblassen aber je nach dem Bufogenin ziemlich rasch und werden alle mehr oder weniger graublauviolett. Die bei den Papierchromatogrammen beobachteten Färbungen sind etwas verschieden von den in der Tab. 1 aufgeführten, in erster Linie wohl deshalb, weil eine vollständige Entfernung der die Farbreaktion störenden Lösungsmittel (vor allem Formamid) nicht möglich ist¹⁴⁾. In Tab. 2 sind die Färbungen der Acetylbufogenine mit SbCl_3 im Tageslicht und unter der UV.-Lampe zusammengestellt, wobei auch hier das eben für die Bufogenine Ausgeführte gilt.

Tabelle 1.Färbungen der Bufogenine mit SbCl_3 auf präpariertem Papier.

Bufogenine	Tageslicht	UV.-Licht
Resibufogenin	blass braungelb	hell ockergelb
Cinobufagin	hell graubraun	orange
Desacetyl-cinobufagin	schwach graurosa	orange
Bufalin	blass grünblau	schwach orangebraun
Bufotalin	stahlgraublau	braun
Desacetyl-bufotalin	silbergrau	graubraun
Cinobufotalin	graublauviolett	rostbraun
Desacetyl-cinobufotalin	violett	rostrot
Marinobufagin	graubraun	braun
Gamabufotalin	wie Bufalin (Gelbstich)	gelbbraun (wie Bufalin)
Bufotalinin	hellocker	hell gelbbraun
Telocinobufagin	hell grauviolett	braun (wie Bufalin)
Hellebrigenin	grüngelb (Rotstich)	gelbgrün

¹³⁾ H. R. Urscheler, Ch. Tamm & T. Reichstein, *Helv.* **38**, 883 (1955).

¹⁴⁾ Ein deutlicher Unterschied in der Farbe lässt sich einzig beim Bufotalinin im UV.-Licht feststellen: auf präpariertem Papier gibt dieses Bufogenin einen leuchtend himmelblauen Flecken an Stelle der in Tab. 1 angegebenen Färbung.

Tabelle 2.Färbungen der Acetyl-bufogenine mit SbCl_3 auf unpräpariertem Papier.

Acetyl-bufogenine	Tageslicht	UV.-Licht
Acetyl-resibufogenin	schwach grau (Gelbstich)	beige
Acetyl-cinobufagin	schwach grau	gelbbraun
Acetyl-bufalin	schwach blaugrau	ocker
Acetyl-bufotalin	ockergrau	braun
Acetyl-cinobufotalin	violett	rostrot
Acetyl-marinobufagin	schwach rotgraubraun	schwach orangebraun
Acetyl-gamabufotalin	blassgrau	ocker
Acetyl-bufotalinin	grau (Braunstich)	beige
Acetyl-telocinobufagin	blauviolett	schmutzig braun
Acetyl-hellebrigenin	grüngelb	hell gelbgrün

Isolierung der Steroide. Die harten Ch'an-Su-Scheiben (887 g) wurden zu feinem Pulver gemahlen, mit dem gleichen Volumen reinem Seesand gemischt und portionenweise im *Soxhlet*-Apparat mit reinem, neutralem Chloroform extrahiert. Erhalten wurden rund 18% (161 g) trockener Chloroformextrakt. Da dieser – wie Vorversuche ergeben hatten – nur wenig saure und basische Bestandteile enthielt (zusammen etwa 0,5%), wurde auf eine Abtrennung dieser Stoffe durch Ausschütteln verzichtet, um das Steroidgemisch nicht unnötig dem Einfluss von Alkalien oder Säuren auszusetzen. Der gesamte so erhaltene Chloroformextrakt wurde zur Entfernung der Sterine zunächst in Methanol-Wasser 4:1 gelöst und erschöpfend mit Pentan extrahiert. Die Pentanauszüge gaben nach dem Verdampfen rund 10 g Rückstand, der an Al_2O_3 chromatographiert, 6,5 g rohes γ -Sitosterin lieferte.

Die mit Pentan extrahierte methanolisch-wässrige Lösung wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und gab 151 g Rückstand. Je 200 γ dieses vorgereinigten Extraktes wurden mit Hilfe der beiden eingangs erwähnten Systeme papierchromatographisch untersucht. Die in den Fig. 1 und 2 wiedergegebenen Papierchromatogramme weisen 9 bzw. 7 bis 9¹⁵⁾ feststellbare Flecken auf, die, was die polarerer Stoffe betrifft, sich vor allem durch ihre verschiedenen Färbungen mit SbCl_3 im Tageslicht und im UV.-Licht unterscheiden. Von den 6 Substanzen, die einen kleineren R_f -Wert als 0,3 aufweisen, konnten nur 2 auf Grund ihrer Laufstrecken und ihrer Färbungen mit früher aus Ch'an Su isolierten Bufogeninen identifiziert werden. Es waren dies Gamabufotalin (XIV) und Telocinobufagin (XVI). Die 4 anderen Flecken (im System mit Formamid) mussten somit von (wenigstens für Ch'an Su) unbekannten Bufogeninen herrühren. Sie wurden vorläufig als Bufogenine A–D bezeichnet. Die 5 weniger polaren Substanzen mit R_f -Werten über 0,5 liessen sich alle mit bekannten Bufo-

¹⁵⁾ Siehe Anm. unter Fig. 2.

Tabelle 3.

Färbungen der Bufogenine mit konz. Schwefelsäure.

Zeit in Minuten	0*	0—1**	5	10	30***	60	120	180	240	300
Resibufogenin . . .	citronengelb	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	gelbgrün	dunkelgrün	grasgrün	<i>item</i>	gelbgrün
Cinobufagin .	gelb	eigeln	<i>item</i> R rotviolett	orange gelb R violettrot	orangerot	tiefweinrot	<i>item</i>	rotviolett	<i>item</i>	blau
Bufalin . . .	schwach citronengelb	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	schwach braungelb	blass violett	grau blau Violettstich	hellblaugrün	<i>item</i>	<i>item</i>
Bufotalin . .	gelb	hell gelbbraun	schwach ocker	<i>item</i>	<i>item</i>	schwach graubraun Violettstich	schwach blauviolett	grau blau	<i>item</i>	<i>item</i>
Cinobufotalin . .	permanaganatrot	blutrot	<i>item</i>	<i>item</i> R violett	permanaganatrot	violett	<i>item</i>	<i>item</i>	schwarzviolett	<i>item</i>
Gama-bufotalin . .	citronengelb	gelb	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	grünbraun	blaugrau Violettstich	blaugrün	grün	<i>item</i>

Marino- bufagin . . .	braun	hellbraun	braun	graubraun	<i>item</i>	oliv	dunkel- grün	graugrün	grau	<i>item</i>
Bufotalin .	graubraun	gelbbraun	<i>item</i>	<i>item</i>	braun	reihbraun	graubraun	<i>item</i>	hellgrau- braun	hellbraun
Telocino- bufagin . . .	orange	gelborange	<i>item</i>	<i>item</i>	helloliv	oliv	dunkel- blau	<i>item</i>	smaragd- grün Blaustich	<i>item</i>
Hellebrigenin	dunkel- orangerot	gelb	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	orange	orangegelb	schmutzig gelb	<i>item</i>	gelb
Desacetyl- cinobufagin .	braun	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	rostbraun	rostrot	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i> Violett- stich	grau Violett- stich
Desacetyl- bufotalin . .	gelb	blass gelbbraun	<i>item</i>	blass graugelb	<i>item</i>	blass braungrau	<i>item</i> Violett- stich	silbergrau	<i>item</i>	<i>item</i>
Desacetyl- cinobufotalin	perman- ganatrot	rostrot	blutrot	violett	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	rotviolett	schwarz- violett	<i>item</i>

Ausführung: Ca. 0,5 mg Substanz
wurden in einer Porzellantüpfelplatte
jeweils auf 3 Tropfen konz. H_2SO_4
(„Merck“ *pro analysi*) aufgestreut.

R = Rand der Schwefelsäure.

* = Färbung der Kristalle.

*** = Von 30 Min. weg wurde

** = Färbung nach Verreiben und Lösung.
vor den Farbbestimmungen jeweils mit einem

Glasstab durchgerührt.

Tabelle 4.
Färbungen der Acetyl-bufogenine mit konz. Schwefelsäure.

Zeit in Minuten	0*	0—1**	5	10	30***	60	120	180	240
Resibufogenin .	gelb	blass citronengelb	citronengelb	<i>item</i>	schmutzig gelbbraun	schmutzig gelbgrün	schmutzig grüngelb	schmutzig braungelb	<i>item</i>
Cinobufagin . .	orange-braun	gelb	orange R violettrot	<i>item</i>	rotviolett	<i>item</i>	grauviolett	grauschwarz	<i>item</i>
Bufoalin . . .	graubraun	braun	<i>item</i>	<i>item</i> R grau	<i>item</i>	grau	graugrün	<i>item</i>	<i>item</i>
Bufofalin . . .	gelborange	schwach gelbbraun	gelbbraun	braun R grau	<i>item</i>	schmutzig violettbraun	grau	<i>item</i>	<i>item</i>
Marinobufagin .	orangerot	orange-blutrot	braun	<i>item</i> R grau	<i>item</i>	oliv	schwach violettgrau	grau	braun-grau
Cinobufotalin .	orangerot	blutrot	<i>item</i> R violett	<i>item</i>	blauviolett	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>
Gamabufotalin .	—	schwach citronengelb	citronengelb	<i>item</i>	schwach gelbbraun	braunoliv	grasgrün	<i>item</i>	<i>item</i>
Bufofotalin . .	schmutzig gelb	schwach schmutzig gelb	schmutzig gelbbraun	<i>item</i>	orange-braun	<i>item</i>	lehmgelb	schwach <i>item</i>	<i>item</i>
Telocinobufagin	orange	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	schmutzig braunviolett	smaragd-grün	<i>item</i>	<i>item</i>
Hellebrigenin .	perman-ganatrot	blass blutrot	<i>item</i>	gelb-braun	braungelb	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>	<i>item</i>

Legende: siehe Tab. 3.

geninen identifizieren, nämlich mit Bufotalin (IX), Bufalin (VI), Cinobufotalin (XII), Cinobufagin (IV) und Resibufogenin (I). Wie aber aus den Fig. 1 und 2 hervorgeht, ist diese Identifizierung nur durch

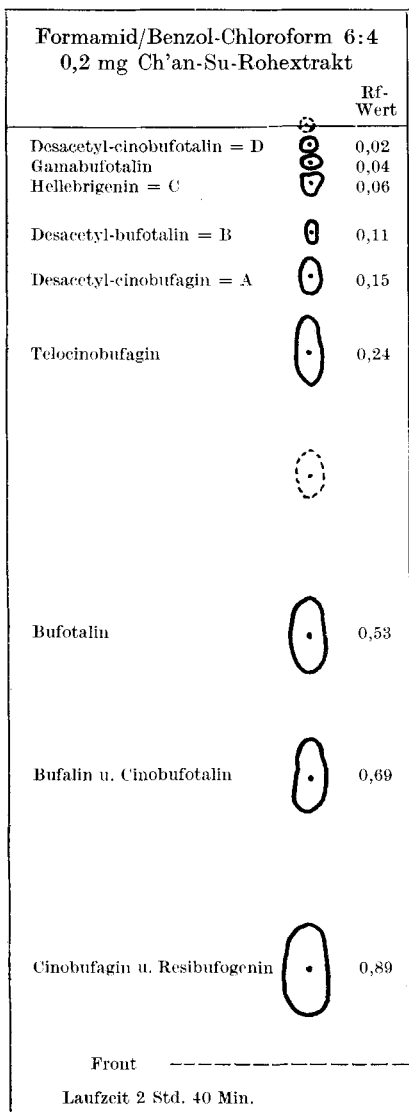


Fig. 1
(etwas schematisiert)

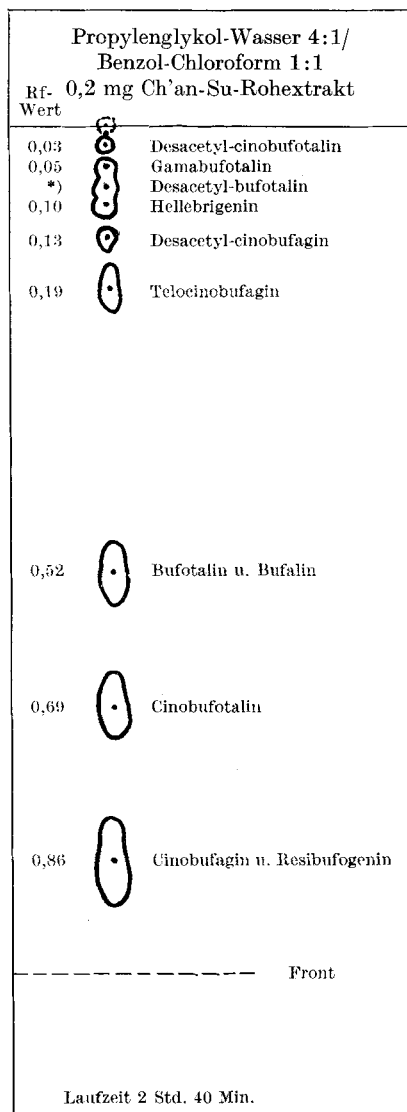


Fig. 2
(etwas schematisiert)

*) Bei längerer Laufzeit lassen sich die Substanzen mit einem Rf-Wert bis 0,10 auch im System mit Propylenglykol-Wasser trennen.

„gekrenzte“ Papierchromatographie möglich: im ersten System gibt einzig Bufotalin einen eigenen Flecken, während die beiden anderen Flecken durch die Paare Bufalin-Cinobufotalin und Cinobufagin-Resibufogenin hervorgerufen werden. Im zweiten System läuft Cinobufotalin für sich allein, während die Paare Bufotalin-Bufalin und Cinobufagin-Resibufogenin einen gemeinsamen Flecken bilden. Cinobufagin und Resibufogenin lassen sich somit mit keinem der verwendeten Systeme papierchromatographisch unterscheiden. Dies ist aber präparativ durch Chromatographie an Al_2O_3 möglich.

Die Reihenfolge der Laufstrecken der Bufogenine ist im Papierchromatogramm (System mit Formamid!) also die folgende: Resibufogenin, Cinobufagin, Cinobufotalin, Bufalin, Bufotalin, Telocinobufagin, Bufogenine A, B, C, Gamabufotalin und Bufogenin D. Bei der präparativen Aufteilung an Al_2O_3 ist die Reihenfolge etwas anders, nämlich: Resibufogenin, Cinobufagin, Bufalin, Bufotalin, Cinobufotalin, Gamabufotalin, Telocinobufagin, Bufogenine A, B, C und D.

In Tab. 5 sind die Rf-Werte dieser 11 im Ch'an Su nachgewiesenen Bufogenine sowie diejenigen von Marinobufagin und Bufotalinin (nebst denjenigen der Acetylverbindungen) zusammengestellt. Die angegebenen Zahlenwerte gelten für *Whatman*-Papier Nr. 1. Sie sind nur für die reinen Bufogenine, also nicht für Gemische gültig. Bei diesen sind, infolge gegenseitiger Beeinflussung, die Rf-Werte der einzelnen Genine etwas anders (siehe Fig. 1 und 2).

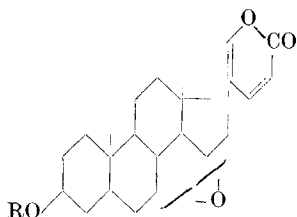
Tabelle 5.

Rf-Werte von 13 Bufogeninen.

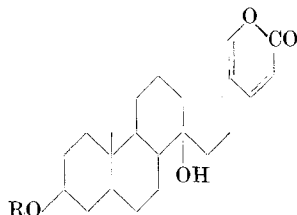
Systeme	Freie Bufogenine		Acetylverbindungen	
	Formamid Bz-Chl 6:4	Pr-H ₂ O 4:1 Bz-Chl 1:1	Formamid Bz-Chl 6:4	Pr-H ₂ O 4:1 Pä-Bz 1:1
Resibufogenin	0,91	0,87	—	0,87
Cinobufagin	0,90	0,87	—	0,87
Cinobufotalin	0,73	0,69	0,94	0,48
Bufalin	0,70	0,49	—	0,53
Marinobufagin	0,69	0,48	—	0,41
Bufotalin	0,56	0,49	—	0,30
Bufotalinin	0,31	0,29	0,84	—
Telocinobufagin	0,26	0,16	0,81	—
Desacetyl-cinobufagin = A	0,18	0,11	—	0,87
Desacetyl-bufotalin = B .	0,10	0,07	—	0,30
Hellebrigenin = C	0,06	0,07	0,43	—
Gamabufotalin	0,03	0,04	—	0,23
Desacetyl- cinobufotalin = D . . .	0,02	0,02	0,94	0,48

Nachdem wir mit Hilfe der Papierchromatographie in dem vorgereinigten Chloroformextrakt eine Reihe von für Ch'an Su neuen Bufogeninen nachweisen konnten, versuchten wir anschliessend auf präparativem Wege die einzelnen Bufogenine rein herauszuarbeiten. Der oben erwähnte von den Sterinen befreite Chloroformextrakt (151 g) wurde in 3 Portionen an je 500 g gereinigtem, neutralem Al_2O_3 nach der Durchlaufmethode chromatographiert.

Resibufogenin (I) und Cinobufagin (IV) wurden als erste Bufogenine gemeinsam eluiert, wobei die ersten Fraktionen beinahe reines Resibufogenin enthielten. Durch direkte Kristallisation aus Aceton-Äther liessen sich rund 35 g kristallisiertes Cinobufagin gewinnen. Aus den vereinigten Mutterlaugen der verschiedenen Cinobufagin-Kristallisate konnten nach Rechromatographie an Al_2O_3 neben wenig Cinobufagin rund 13,5 g rohes Resibufogenin erhalten werden. Zur Charakterisierung des letzteren wurden die bekannte kristallisierte Acetylverbindung und das kristallisierte Hydrochlorid⁶⁾ bereitet. Nach dem Cinobufagin wurde in einer grösseren Anzahl Fraktionen Bufalin (VI) von der Säule abgelöst. Dieses Bufogenin liess sich in der Regel zunächst nicht aus Aceton in Kristallen gewinnen, da sich beim Einengen dieses Lösungsmittels Gallerten bildeten. Aus Methanol als Lösungsmittel konnten dagegen meist ohne Schwierigkeiten Kristalle erhalten werden, die sich dann auch aus Aceton leicht umkristallisieren liessen. Während es früher³⁾ nicht gelang, das dem Bufalin im Chromatogramm folgende Bufotalin (IX) in Kristallen zu gewinnen – dort konnte dieses Bufogenin nur als Acetylverbindung gefasst werden –, liess sich dieses Bufogenin in der vorliegenden Arbeit bei allen 3 Chromatogrammen jeweils aus einigen Fraktionen kristallin abscheiden. Bufotalin bildet mit Bufalin äusserst leicht Mischkristalle, wobei das letztere nur zu etwa 10% im Mischkristallinat enthalten ist. Es ist deshalb jeweils nur bei denjenigen Fraktionen möglich, reines Bufotalin zu gewinnen, die praktisch nur dieses Bufogenin enthalten. Bufotalin (IX) kristallisiert aus Aceton allein in prächtig ausgebildeten klaren Tetraedern, aus Aceton-Äther werden dagegen feine, glänzende Nadelchen erhalten. Der Smp. beider Formen liegt bei 223–227°. Die Hauptmenge des Bufotalins wurde als Acetylverbindung X gewonnen, da diese durch Chromatographie an Al_2O_3 leicht vom Acetylbufalin (VII) getrennt werden kann. Cinobufotalin (XII) liess sich wiederum wie früher³⁾ ohne Schwierigkeiten in Kristallen gewinnen, enthielt aber in den letzten Fraktionen meist etwas Gamabufotalin (XIV). Da sich dieses unmittelbar dem Cinobufotalin folgende Bufogenin aber durch seine ausserordentlich geringe Löslichkeit in Aceton und Chloroform auszeichnet, liessen sich die Mischfraktionen relativ leicht in die Komponenten zerlegen: nach Abtrennung des schwerlöslichen Gamabufotalins wurden die Mutterlaugen nochmals an Al_2O_3 chromatographiert,

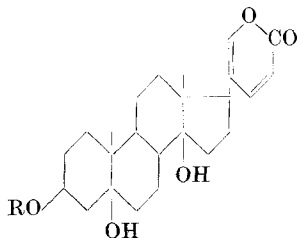


- I (R=H) Resibufogenin, amorph [−5]⁶⁾
 II (R=Ac) F. 215—222^{0 11a)} [−1]⁶⁾



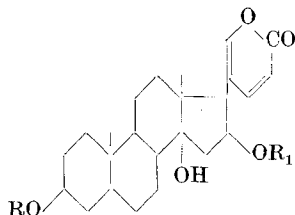
- VI (R=H) Bufalin F. 244⁰ [−9]⁷⁾
 F. 238—242^{0 a)}
 VII (R=Ac) F. 230—247⁰ [−6]⁷⁾

- XI Bufogenin D = Desacetyl-cinobufotalin F. 251—261⁰ [+34 Me]^{a)}
 XII Cinobufotalin F. 259—262^{0 3)}
 F. 257—259^{0 a)} [+11]³⁾
 XIII Acetyl-cinobufotalin F. 212—214^{0 3)}
 F. 215—218⁰ [+24]³⁾ [+10 Me]^{a)}

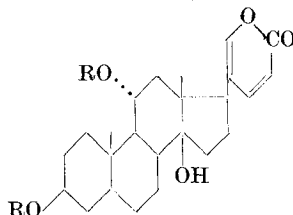


- XVI (R=H) Telocinobufagin F. 160—175⁰/
 210—211^{0 3)} F. 160⁰/207—211⁰ [+4]³⁾
 XVII (R=Ac) Acetyl-telocinobufagin
 F. 270—278⁰ [+23]³⁾ F. 263—275^{0 a)}

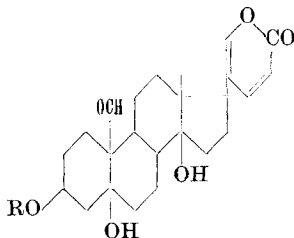
- III Bufogenin A = Desacetyl-cinobufagin, amorph [+27]^{a)}
 IV Cinobufagin F. 216—217^{0 a)}
 F. 160—170⁰/213—215^{0 3)} [−4]³⁾
 V Acetyl-cinobufagin F. 203—204^{0 3)}
 F. 199—201^{0 a)} [−2]³⁾



- VIII (R=R₁=H) Bufogenin B = Desacetyl-bufotalin F. 210—223⁰ [+30 Dioxan]^{a)}
 IX (R=H, R₁=Ac) Bufotalin F. 222^{0 b)}
 F. 223—227^{0 a)} [+5]^{b)} [+4]¹²⁾
 X (R=R₁=Ac) Acetyl-bufotalin F. 269—272^{0 b)}
 [+4]³⁾, [−2 Dioxan]^{a)} F. 256—262^{0 a)}



- XIV (R=H) Gamabufotalin F. 261—263^{0 c)}
 [+1 Me] F. 254—260^{0 a)}
 XV (R=Ac) Acetyl-gamabufotalin F. 265—266^{0 3)}
 F. 257—259⁰ [−10]³⁾ bzw. [−13 Me]^{a)}



- XVIII (R=H) Hellebrigenin F. 236—239⁰
 [+18 An]^{d) 25)} F. 239—249⁰ [+17]^{a)}
 XIX (R=Ac) Acetyl-hellebrigenin
 F. 242—247⁰ [+34]^{d) 25)} F. 229—247^{0 a)}

Ac = CH₃CO-. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Grade auf- oder abgerundeten spez. Drehungen für Na-Licht an: ohne Bezeichnung = Chloroform, Me = Methanol, An = Aceton.

^{a)} Siehe Exper. Teil dieser Arbeit.

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

^{c)} M. Kotake, Liebigs Ann. Chem. **465**, 11 (1928).

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

wobei das nun im Gemisch sehr stark überwiegende Cinobufotalin praktisch quantitativ vom Gamabufotalin abgetrennt werden konnte. Gamabufotalin war früher³⁾ nicht als freies Bufogenin gefasst worden, da der damals zur Verfügung stehende Extrakt infolge der verlustreichen Vorreinigung nur sehr wenig von diesem Bufogenin enthielt. Es konnte dort erst nach Chromatographie der acetylierten Mutterlaugen von Cinobufotalin als Acetylverbindung XIII in Kristallen gefasst werden. Die auf Gamabufotalin folgenden Fraktionen enthielten zur Hauptsache Telocinobufagin (XVI), das leicht in Kristallen gewonnen werden konnte. Die späteren Eluate waren alle wieder amorph. Die Papierchromatogramme wiesen jeweils eine Reihe neuer Flecken auf, die durch ihre relativ geringen R_f -Werte und ihre verschiedenen Färbungen mit Antimontrichlorid charakterisiert waren, und deckten sich weitgehend mit den papierchromatographischen Befunden, die mit dem vorgereinigten Ch'an-Su-Rohextrakt erhalten worden waren (siehe Fig. 1 und 2).

Isolierung der Substanzen A, B, C, D und E. Die Mutterlaugen der verschiedenen Kristallisationen von Cinobufotalin, Gamabufotalin und Telocinobufagin sowie die amorphen Endfraktionen der drei Grosschromatogramme wurden vereinigt und einer erneuten sorgfältigen Aufteilung an Al_2O_3 unterzogen. Dabei konnten noch etwas Kristalle von Cinobufotalin und Gamabufotalin erhalten werden. Die mit reinem Chloroform gewonnenen Eluate waren amorph und enthielten auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen die Substanzen A und B sowie Telocinobufagin. Letzteres konnte z. T. durch Kristallisation abgetrennt werden. Die Mutterlaugen wurden mit den amorphen Chloroformfraktionen vereinigt und einer Verteilungschromatographie unterworfen (siehe weiter unten). Aus den ersten mit Chloroform-Methanol gewonnenen Fraktionen der obigen Al_2O_3 -Chromatographie liessen sich wieder Kristalle erhalten = Bufogenin C. Diese erstmals in Ch'an Su aufgefundene Substanz war ziemlich schwer in Aceton löslich und konnte demzufolge weitgehend in kristallisierter Form abgeschieden werden. Bei der näheren Untersuchung erwies sie sich in allen Punkten als identisch mit Hellebrigenin (XVIII). Die späteren Fraktionen mit einem etwas höheren Methanolgehalt enthielten einen weiteren für Ch'an Su neuen Stoff, Substanz D, der in farblosen Prismen kristallisierte, die äusserst schwer in Chloroform löslich waren und bei 251–261° unter Zersetzung schmolzen. Im UV. zeigte die neue Substanz ein Maximum bei ca. 295 $m\mu$ ($\log \epsilon = 3,72$). Die Analysenergebnisse passten gut auf die Bruttoformel $C_{24}H_{34}O_6$. Die durch übliche Acetylierung in Acetanhydrid-Pyridin gewonnene Acetylverbindung der Substanz D erwies sich in allen Punkten als identisch mit dem Acetyl-cinobufotalin (XIII). Substanz D ist deshalb als Desacetyl-cinobufotalin (XI) zu bezeichnen.

Herr Dr. *K. K. Chen*¹⁶⁾ hatte die Freundlichkeit, Substanz D = Desacetyl-cinobufotalin (XI) sowohl am Frosch wie an der Katze auf Digitaliswirkung zu prüfen. Dabei konnte er überraschenderweise praktisch überhaupt keine Herzaktivität feststellen. Dies ist sehr bemerkenswert, denn Cinobufotalin, das als natürliche Monoacetylverbindung der Substanz D anzusprechen ist, zeigt im Mittel eine letale Dosis von $0,1990 \pm 0,0244$ mg/kg Katze³⁾. Wir haben deshalb Herrn Dr. *K. K. Chen*¹⁶⁾ gebeten, auch die Acetylverbindung der unwirksamen Substanz C, die eine Di- oder Triacetyl-Verbindung ist (= Acetyl-cinobufotalin), zu prüfen. Diese war wirksam und zeigte in der Toxizitätsprüfung an der Katze (10 Tiere) im Mittel eine letale Dosis von $0,1786 \pm 0,0129$ mg/kg. Die Peracetylverbindung von XI ist somit sogar noch etwas wirksamer als Cinobufotalin¹⁷⁾.

Die letzten Fraktionen des Al_2O_3 -Chromatogramms enthielten nur wenig Substanz und waren grösstenteils amorph. Aus 1–2 Fraktionen liessen sich aber jeweils etwas Kristalle gewinnen, die bei $232\text{--}237^\circ$ schmolzen = Substanz E. Diese Substanz ist äusserst schwer in Chloroform löslich, zeigt aber zwischen $210\text{--}280\text{ m}\mu$ keine selektive Absorption. Substanz E ist somit kein Bufogenin. Im IR. waren weder Carbonyl- noch Esterbanden, dagegen eine ausgeprägte Hydroxylbande feststellbar. Die Analysenergebnisse passten auf die Bruttoformel $\text{C}_{27}\text{H}_{46-48}\text{O}_3$. Acetylierung gab eine Diacetylverbindung. Möglicherweise handelt es sich bei der Substanz E um ein Sterin mit 2 acylierbaren und einer nicht acylierbaren HO-Gruppe.

Die oben erwähnten Mutterlaugen der Telocinobufaginkristallisate sowie die amorphen Chloroformfraktionen wurden vereinigt und der Verteilungschromatographie unterworfen, wobei als ruhende Phase Propylenglykol-Wasser 4:1 auf Kieselgur und als bewegliche Phase Benzol-Chloroform 1:1 dienten. Trotz Aufteilung in über 50 Fraktionen erwies sich nicht eine einzige davon im Papierchromatogramm als einheitlich. Immerhin konnte eine gewisse Trennung erreicht werden, indem eine Reihe von Fraktionen z. B. nur Telocinobufagin und Substanz A und eine andere, die die letzten Fraktionen umfasste, nur Substanzen A und B enthielten. Letztere konnten nach Acetylierung und Chromatographie an Al_2O_3 als Acetylverbindungen glatt getrennt werden. Erhalten wurden dabei Acetyl-cinobufagin (V)

¹⁶⁾ Wir danken Herrn Dr. *K. K. Chen*, Indianapolis (USA), bestens für die Ausführung dieser Prüfungen.

¹⁷⁾ Resibufogenin ist ebenfalls herzwirksam. Nachdem Substanz C = Desacetyl-cinobufotalin sich als unwirksam erwiesen hatte, seine Peracetylverbindung aber eine starke Herzaktivität zeigte, hat Herr Dr. *K. K. Chen* auch Acetyl-resibufogenin (II) geprüft. Er fand, dass dieses, wie Resibufogenin selbst, völlig unwirksam ist, woraus höchstens geschlossen werden kann, dass diese sich einzig in pharmakologischer Beziehung auswirkende strukturelle Besonderheit des Desacetyl-bufotalins und seiner verschiedenen Acetylverbindungen kaum auch beim Resibufogenin vorliegen dürfte. Somit müssen beim Desacetyl-cinobufotalin andere bisher unerklärbare Verhältnisse angenommen werden.

und Acetyl-bufotalin (X). Die Substanzen A und B müssen somit die entsprechenden Desacetylprodukte der Bufogenine Cinobufagin und Bufotalin darstellen. Dies liess sich experimentell noch genauer beweisen (siehe weiter unten). Durch eine erneute Verteilungschromatographie mit dem System Formamid als ruhende Phase und Benzol-Chloroform 6:4 als bewegliche Phase konnten die Telocinobufagin und Substanz A enthaltenden Fraktionen in die Komponenten aufgeteilt werden, wobei es allerdings nicht gelang, Substanz A = Desacetyl-cinobufagin in Kristallen zu gewinnen, obwohl das erhaltene Material sich papierchromatographisch als einheitlich erwies und bei der Acetylierung in quantitativer Ausbeute das bekannte Acetyl-cinobufagin gab.

Substanz A = Desacetyl-cinobufagin (III) durch partielle Verseifung von Cinobufagin. Wird Cinobufagin mit KHCO_3 in Methanol-Wasser 5 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen, so wird die Acetoxy-Gruppe praktisch vollständig verseift und man erhält in beinahe quantitativer Ausbeute Desacetyl-cinobufagin (III). Dieses konnte auch nach Chromatographie an Al_2O_3 nicht zur Kristallisation gebracht werden, erwies sich aber papierchromatographisch als völlig einheitlich und zeigte genau dieselben Rf-Werte wie die Substanz A aus Ch'an Su. Acetylierung gab auch hier in quantitativer Ausbeute das kristallisierte Acetyl-cinobufagin (V).

Substanz B = Desacetyl-bufotalin (VIII) durch partielle Verseifung von Bufotalin. Wird Bufotalin analog wie Cinobufagin in Methanol-Wasser mit KHCO_3 stehengelassen, so tritt nur sehr unvollständig Verseifung der Acetoxygruppe ein. Ausserdem scheinen noch andere Veränderungen vor sich zu gehen. Wohl gelingt es, aus dem Verseifungsgemisch das gesuchte Desacetyl-Produkt herauszuarbeiten, doch sind die Ausbeuten sehr gering. Substanz D konnte in Kristallen vom Smp. $210-223^\circ$ gewonnen werden, die sich als äusserst schwerlöslich in Chloroform erwiesen. Im Papierchromatogramm wurden genau dieselben Rf-Werte erhalten wie mit Substanz B aus Ch'an Su. Acetylierung gab das bekannte Acetyl-bufotalin. Herr Dr. K. K. Chen¹⁶⁾ hat auch von Substanz B eine Toxizitätsprüfung an der Katze durchgeführt und dabei die letale Dosis mit $0,2634 \pm 0,0195$ mg/kg (Mittel von 10 Tieren) bestimmt. Da früher¹⁸⁾ in analoger Versuchsanordnung für Bufotalin der Wert $0,1317 \pm 0,0069$ gefunden wurde, ist Substanz B somit nur halb so toxisch wie ihre 16-Acetoxyverbindung.

Besprechung der Ergebnisse. Die erneute und eingehende Untersuchung der chloroformlöslichen Bestandteile der chinesischen Krötengiftdroge Ch'an Su, die Gegenstand vorliegender Arbeit war, hat die Isolierung von 11 einheitlichen Bufogeninen ergeben. Davon konnten 4 zum ersten Male im Ch'an Su nachgewiesen werden. Da

¹⁸⁾ K. K. Chen, R. C. Anderson & E. B. Robbins, J. Amer. pharmac. Assoc. **27**, 113 (1938).

diese neuen Bufogenine alle in relativ geringen Mengen im Ch'an Su vorkommen und es sich bei ihnen ausserdem um stark polare Substanzen handelt, ist es leicht verständlich, wenn sie früheren Untersuchern auch bei Anwendung der chromatographischen Trennung an Al_2O_3 entgangen sind. Sieht man von diesen 4 neu aufgefundenen Bufogeninen ab, so kann man eine praktisch vollständige Übereinstimmung der hier gewonnenen Resultate mit den Ergebnissen früherer Arbeiten feststellen¹⁹⁾, d. h. Ch'an Su zeichnet sich durch eine ganz auffallende Konstanz in der Zusammensetzung aus, die sich über Jahrzehnte zurück an den verschiedensten Mustern verfolgen lässt. Dies spricht sehr für die Richtigkeit von Chen's Vermutung²³⁾, dass diese Droge allein von der chinesischen Kröte *Bufo gargarizans Cantor* = *Bufo asiaticus* gewonnen wird.

Experimenteller Teil.

Alle Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Äther oder Äther-Chloroform (4:1), Waschen mit 2-n. HCl, 2-n. Sodalösung und Wasser, Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen im Vakuum. Die bei Lösungsmitteln angegebenen Zahlenangaben beziehen sich auf Volumenverhältnisse. In den Tabellen und im Text gelten folgende Abkürzungen: Ä = Äther, Al = Äthanol, An = Aceton, Bz = Benzol, Chl = Chloroform, Me = Methanol, Pä = Petroläther (Sdp. bis 50°).

Ausführung der Papierchromatographie. Für die Verteilung der freien Bufogenine wurde die von Bolliger & Meyer^{11a)} angegebene Technik benützt und die beiden dort beschriebenen Systeme Formamid/Benzol-Chloroform 6:4 und Propylenglykol-Wasser 4:1/Benzol-Chloroform 1:1 verwendet. — Für die Papierchromatographie der Acetylbufogenine musste etwas anders vorgegangen werden. Für die polaren Acetylverbindungen wie die des Bufotalins, Cinobufotalins, Telocinobufagins und Hellebrigenins war das System Formamid/Benzol-Chloroform 6:4 brauchbar, während alle andern in dieser Arbeit beschriebenen Acetylbufogenine in diesem System Auflösungserscheinungen zeigten oder direkt mit der Front wanderten. Für die Papierchromatographie der schwach polaren Acetylverbindungen erwies sich das System Propylenglykol-Wasser 4:1/Petroläther-Benzol 1:1 als brauchbar. Die oben erwähnten polaren Acetylverbindungen zeigten mit Ausnahme des Acetyl-cinobufotalins in diesem System starke Schwanzbildung.

Gewinnung der Bufogenine aus der chinesischen Krötengiftdroge Ch'an Su.

887 g der äusserst harten, glatten, braunschwarz gefärbten und diskusförmigen Scheiben von Ch'an Su (Durchmesser etwa 6—8 cm, Dicke etwa 0,5—1,5 cm, Gewicht je 20—70 g) wurden im Eisenmörser grob zerstossen (auf etwa Erbsengrösse) und hierauf

¹⁹⁾ Einzig die beiden von Kondo & Ohno beschriebenen Bufogenine „Pseudodesacetylbufotalin“²⁰⁾ und Cinobufotalidin²¹⁾ konnten hier ebensowenig aufgefunden werden wie früher³⁾, was wiederum eine Bestätigung der vergeblichen Versuche von Kotake & Kuwada²²⁾, dieses „Pseudodesacetylbufotalin“ im Ch'an Su aufzufinden, darstellt.

²⁰⁾ H. Kondo & S. Ohno, J. pharmac. Soc. Japan **58**, 15 (1938); Chem. Zbl. **1938**, I, 3929.

²¹⁾ H. Kondo & S. Ohno, J. pharmac. Soc. Japan **58**, 235 (1938); Chem. Zbl. **1939**, II, 1682.

²²⁾ M. Kotake & K. Kuwada, Scient. Pap. Inst. physic. and chem. Research (Tokyo) **32**, 1 (1937); Chem. Zbl. **1937**, II, 1588.

²³⁾ K. K. Chen & A. L. Chen, J. Pharmacol. and Exp. Therap. **49**, 543 (1933).

in der Kaffeemühle²⁴⁾ des „Turmix“ pulverisiert. Die feinen Anteile wurden ausgesiebt (Sieb VII der Pharmakopoea Helvetica V). Die auf dem Sieb verbliebenen Anteile wurden mit weiteren Mengen der zerstoßenen Droge erneut im „Turmix“ zertrümmert. Es liess sich auf diese Weise der grösste Teil der zur Verfügung stehenden Droge als staubfeines Pulver gewinnen, während der Rest (etwa 10%) in grobkörniger Form (etwa in der Korngrösse des üblich verwendeten Seesandes) anfiel. Dieses wurde mit dem feinen Pulver vermischt, mit dem gleichen Volumen an reinem, trockenem Seesand vermischt, in einer Porzellanschale mit gerade so viel neutralem Chloroform versetzt, dass nach Durcharbeiten ein lockeres gleichmässig durchfeuchtetes Pulver entstand und sofort in passende Cellulosehülsen eingefüllt. Nach Verschliessen mit chloroformfeuchtem Wattestopfen wurden die zu $\frac{2}{3}$ gefüllten Hülsen im *Soxhlet*-Apparat mit neutralem Chloroform extrahiert. Schon nach 1—2 Std. war jeweils die Hauptmenge der chloroformlöslichen Anteile aus dem Drogenpulver herausgelöst. Es empfiehlt sich, nach dieser Zeit zur Schonung der extrahierten Stoffe die Extraktion zu unterbrechen. Die gelb bis gelbbraun gefärbten Chloroformlösungen wurden vereinigt und im Vakuum zum Schaum eingedampft. Aus 887 g Droge liessen sich so 161 g trockener Rohextrakt gewinnen. Der Inhalt der Extraktionshülsen wurde (nach dem Trocknen an der Luft) im Mörser verrieben und nach Anfeuchten mit Chloroform wie oben im Extraktionsapparat 12 Std. mit frischem, neutralem Chloroform ausgezogen. Nach Eindampfen im Vakuum resultierte eine zähe dunkelbraune Masse (ca. 5 g), die bisher nicht weiter untersucht wurde.

Vorreinigung des trockenen Rohextraktes. Der schaumige Rohextrakt (161 g) wurde in etwa 400 cm³ Methanol gelöst, mit 100 cm³ H₂O versetzt und erschöpfend mit Pentan ausgeschüttelt. Die mit Pentan ausgezogene methanolisch-wässrige Lösung wurde in kleineren Anteilen im Vakuum zum trockenen Schaum eingedampft und jeweils herausgekratzt. Weitere Aufarbeitung siehe weiter unten. Die Pentanauszüge wurden vereinigt und gaben nach dem Verdampfen rund 10 g Rückstand. Dieser wurde an 250 g Al₂O₃ chromatographiert. P_a-Bz 1:3 bis Bz-Chl 19:1 eluierten rund 6,5 g Substanz. Aus Aceton nach zweimaligem Umlösen 4,1 g reines γ -Sitosterin vom Smp. 150—152°. Eine Probe des reinen Sterins gab, in üblicher Weise (Acetanhydrid/Pyridin) acetyliert, Acetyl- γ -sitosterin vom Smp. 133—136°.

Chromatographische Aufteilung des vorgereinigten Chloroform-Rohextraktes. Der vom γ -Sitosterin befreite Rohextrakt wurde in 3 Portionen zu je 50 g an 600 g²⁵⁾ Al₂O₃²⁶⁾ (500-g-Säule) nach der Durchlaufmethode chromatographiert²⁷⁾.

²⁴⁾ Die Schneiden sind nach der Pulverisierung von etwa 500 g Droge völlig stumpf und müssen dann durch neue ersetzt werden.

²⁵⁾ Es zeigte sich, dass es nicht nötig ist, die sonst übliche Menge an Al₂O₃ zu verwenden. Die Aufteilung liess sich mit der 12fachen Menge Al₂O₃ mindestens ebenso gut erreichen wie mit der sonst üblichen 30fachen Menge. Dadurch wird es möglich, relativ grosse Mengen Substanz bei geringem Verbrauch an Al₂O₃ und Lösungsmitteln chromatographisch aufzuteilen.

²⁶⁾ Verwendetes Aluminiumoxyd. a) Frisches Al₂O₃ „Merck“ standardisiert nach Brockmann wurde durch wiederholtes Waschen mit heissem Wasser von der Hauptmenge Alkali befreit, hierauf in der 5fachen Menge Wasser mit soviel Salpetersäure versetzt, dass eine Suspension ein pH von 6—6,5 (Glaselektrode) aufwies. Nach mehrmaligem Waschen mit heissem dest. Wasser wurde noch 2mal mit heissem Methanol gewaschen, abgenutscht, bei 50—60° getrocknet und 30 Min. im Vakuum (Wasserstrahlpumpe) bei 175—180° aktiviert. b) Gebrauchtes Al₂O₃ wurde mit der 5—6fachen Menge heissem Wasser angerührt, mit 50-proz. KOH bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt und anschliessend mehrmals mit heissem Wasser durch Aufschlemmen, Absitzenlassen und Abdekantieren gewaschen, bis die Spülwässer völlig farblos waren. Hierauf wurde wie unter a) das pH mit Salpetersäure auf 6—6,5 gebracht und im weiteren wie dort verfahren.

²⁷⁾ Der von γ -Sitosterin befreite Rohextrakt enthält erfahrungsgemäss nur wenig saure und kaum basische Bestandteile. Wir haben deshalb auf eine Abtrennung dieser Stoffe durch Ausschüttlung in Chloroform verzichtet, weil diese infolge Emulsionsbildung mit verd. Na₂CO₃-Lösung beschwerlich ist. Al₂O₃ hält die sauren Stoffe so fest, dass diese auf der Säule zurückbleiben und damit glatt von den gesuchten Steroiden abgetrennt werden können.

Dabei wurde wie folgt verfahren: das zu chromatographierende Gemisch wurde mit soviel Chloroform versetzt, dass eben Lösung eintrat. Hierauf wurde bis zum Verhältnis Bz-Chl 97:3 reines Benzol zugegeben. Dabei schied sich eine schmierig-weiche Masse ab. Die überstehende Lösung wurde auf die mit Benzol bereitete Säule gebracht²⁸⁾. Die im Kolben verbliebene Masse wurde wieder wie oben in Chloroform gelöst und mit Benzol versetzt. Mit der Zeit liess sich so im Zuge der fortschreitenden Chromatographie alles Material bis auf einen kleinen schwarz gefärbten, teerigen Rest, der sogar in Methanol unlöslich war, auf die Säule bringen. In Tab. 6 sind die Ergebnisse eines dieser 3 Grosschromatogramme zusammengestellt.

Tabelle 6.

Beispiel einer Aufteilung von 50 g vorgereinigtem Chl-Extrakt an Al_2O_3 .

Fraktion	Lösungsmittel-gemisch	Menge in g	Bufo-nine, in Klammern Menge Kristalle in g
1—7	Bz-Chl 97:3	0,02	Reste von γ -Sitosterin
8—10	Bz-Chl 97:3	4,56	Cinobufagin (11,7) und
11—20	Bz-Chl 19:1	12,79	Resibufogenin
21—23	Bz-Chl 9:1	0,85	
24	Bz-Chl 9:1	0,30	Cinobufagin und Bufalin
25—26	Bz-Chl 9:1	0,57	
27—31	Bz-Chl 17:3	2,23	Bufalin (2,07)
32—33	Bz-Chl 17:3	0,49	
34—37	Bz-Chl 4:1	0,77	Bufalin (0,67)
38—39	Bz-Chl 7:3	0,59	
40	Bz-Chl 7:3	0,37	Bufalin und Bufotalin
41—42	Bz-Chl 7:3	0,78	
43—46	Bz-Chl 3:2	1,64	Bufotalin (1,225)
47—48	Bz-Chl 3:7	0,54	Bufotalin u. Cinobufotalin
49—55	Bz-Chl 3:7	3,69	
56—57	Bz-Chl 1:4	0,48	Cinobufotalin (2,66)
58	Bz-Chl 1:4	0,50	
59—66	Chl	4,90	Gamabufotalin (2,30)
67—68	Chl-Me 199:1	0,42	
69	Chl-Me 99:1	0,45	amorph
70	Chl-Me 99:1	0,75	
71	Chl-Me 49:1	0,63	Telocinobufagin (1,35)
72	Chl-Me 19:1	2,15	
73—74	Chl-Me 19:1	1,16	amorph
75	Chl-Me 9:1	0,10	amorph
76	Me	0,08	amorph
77	Me	0,06	amorph
		41,87	

²⁸⁾ Wobei gleichzeitig soviel gereinigtes *Hyflo-Super Cel* unter Rühren zugegeben wurde, dass dieses nach dem Absitzen über dem Al_2O_3 eine Schichthöhe von 2—3 cm erreichte, wodurch sich ein Verstopfen der Säule vermeiden lässt. Durch gelegentliches Aufrühren der Kieselgurschicht kann die verminderte Durchlaufgeschwindigkeit der Lösungsmittel wieder normalisiert werden.

Cinobufagin (IV). Dieses zusammen mit Resibufogenin eluierte Bufogenin liess sich durch Kristallisation aus An-Ä beinahe quantitativ von letzterem abtrennen. Die Rohkristallisate aus allen 3 Chromatogrammen wurden vereinigt und aus Me umkristallisiert, wobei sich prächtige, völlig klare Tetraeder abschieden, die scharf bei 213–215° schmolzen. (Aus An-Ä kristallisiert, schmilzt dieses Bufogenin z. T. schon bei 160–170°, um dann zwischen 213–215° sich endgültig zu verflüssigen.)

Resibufogenin (I). Die Mutterlaugen der rohen Cinobufaginkristallisate, die das amorphe Resibufogenin enthielten, wurden vereinigt und einer erneuten Aufteilung an Al_2O_3 unterworfen. Die Lösungsmittel Pā-Bz 1:3, Bz, Bz-Chl 19:1, 9:1, 4:1, 3:2 und die ersten Fraktionen Bz-Chl 3:7 gaben 13,5 g rohes Resibufogenin. Acetylierung einer Probe mit Acetanhydrid/Pyridin gab das durch seine beiden verschiedenen Kristallmodifikationen (Tetraeder bzw. Nadeln) charakterisierte Acetyl-resibufogenin (II). Smp. 215–222°²⁹⁾.

Bufalin (VI). Die ersten Bufalin enthaltenden Fraktionen (entsprechend Frakt. 25–31 der Tab. 6) kristallisierten aus An spontan und gaben durchsichtige, dicke Prismen. Die späteren Fraktionen liessen sich aus An oder An-Ä auch nach Animpfen mit Bufalin nicht zur Kristallisation bringen, es resultierten lediglich gallertige Niederschläge. Durch Aufnehmen in reinem Me dagegen konnten schön ausgebildete Kristalle gewonnen werden, die nach dem Umlösen aus An ohne Gallertbildung in den für Bufalin typischen Prismen kristallisierten. Smp. 238–242°.

Bufotalin (IX). Die letzten Fraktionen mit Bz-Chl 7:3 und diejenigen mit 3:2 gaben aus An durchsichtige Tetraeder, die bei 223–226° (Sint. ab 215°) schmolzen. Beim Umkristallisieren aus An-Ä wurden feine Nadeln erhalten, die bei 223–227° (Sint. ab 221°) sich verflüssigten. Durch erneutes Auflösen in reinem An und starkes Einengen liessen sich nach einigem Stehen oder nach Animpfen wieder die typischen Tetraeder gewinnen. Die in üblicher Weise bereitete Acetylverbindung gab aus An längliche, dünne zu Rosetten vereinigte hexagonale Platten vom Smp. 256–260° (unter Zers.) (X).

Cinobufotalin (XII). Dieses Bufogenin wurde mit Bz-Chl 3:7 und 1:4 eluiert und liess sich leicht aus An in völlig klaren, schön ausgebildeten Oktaedern³⁰⁾ gewinnen. Smp. 257–259° (Sint. ab 253°).

Gamabufotalin (XIV). Dieses Bufogenin schied sich aus den Fraktionen Bz-Chl 1:4, Chl und Chl-Me 199:1 schon beim Eindampfen aus und erwies sich als sehr schwer löslich in Chl und An. Gamabufotalin ist etwas besser löslich in Me und gab aus diesem Lösungsmittel feine Kristallnadelchen, die bei 254–260° (Zers. und Sintern ab 248°) schmolzen. Längeres Erhitzen mit Me führt zu gelblicher Verfärbung. $[\alpha]_D^{25} = +1,26^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,793$ in Me). Die in üblicher Weise bereitete Acetylverbindung XV kristallisierte aus An in zu Rosetten vereinigten Prismen, die bei 257–259° (Sint. ab 253°) schmolzen. $[\alpha]_D^{25} = -13^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,931$ in Me); $[\alpha]_D^{25} = -11,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,095$ in Chl).

Telocinobufagin (XVI). Das aus den Fraktionen mit Chl-Me 99:1, 49:1 und 19:1 erhaltene, zunächst amorphe Material kristallisierte nach dem Verflüssigen mit An spontan und gab flache Prismen, die den Doppel-Smp. ca. 160°/207–211° zeigten. $[\alpha]_D^{25} = +4,7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,069$ in Chl).

Isolierung der Substanzen A, B, C, D und E.

Die Mutterlaugen der verschiedenen Kristallisationen von Cinobufotalin, Gamabufotalin und Telocinobufagin sowie die amorphen Endfraktionen der drei Grosschromatographien (entsprechend Fraktionen 49–77 der Tab. 6) wurden vereinigt und über eine mit Bz-Chl 3:2 bereitete Säule von Al_2O_3 (30fache Menge) chromatographiert, wobei beim Aufgiessen wie früher beschrieben verfahren wurde. Die Fraktionen Bz-Chl mit steigendem Gehalt an Chl enthielten nur Cinobufotalin und Gamabufotalin. Reines Chl eluierte ein Gemisch von 3 Substanzen. Durch Animpfen konnte die eine, nämlich Telocinobufagin, z.T. in Kristallen abgeschieden werden, während die andern als A und B

²⁹⁾ Die früher⁶⁾ angegebenen Schmelzpunkte (215–230°) sind zu hoch; vgl. auch ^{11a)}.

³⁰⁾ Früher³⁾ versehentlich als Tetraeder bezeichnet.

bezeichneten unbekannten Stoffe nicht zur Kristallisation gebracht werden konnten. Die Mutterlaugen der Telocinobufaginkristallisate und die amorphen Fraktionen wurden deshalb vereinigt und der Verteilungschromatographie unterworfen (siehe Verteilungschromatographie I weiter unten).

Substanz C = Hellebrigenin (XVIII). Aus den mit Chl-Me 199:1 gewonnenen Fraktionen liessen sich auf Zusatz von wenig An Kristalle gewinnen, die zunächst den Doppel-Smp. 150—160°/216—232° zeigten und sich in An als ziemlich schwer löslich erwiesen. Aus Me umkristallisiert dachziegelförmige, zu Drusen vereinigte Platten vom Smp. 239—249° (Sint. ab 230°). $[\alpha]_D^{20} = +17,2^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 0,9938$ in Chl). Zur Analyse: 5 Std. bei 60° und 0,02 Torr getrocknet.

$C_{24}H_{32}O_7$	Ber. C 69,20	H 7,74	O 23,06%
(432,49)	Gef. „ 68,82	„ 8,13	„ 23,46%

Das UV.-Absorptionsspektrum zeigte das für den α -Pyroneering der Krötengifte typische Maximum bei 300 $m\mu$ ($\log \epsilon = 3,80$). Die Substanz erwies sich im Papierchromatogramm als einheitlich. Rf-Wert sowie die Färbungen mit konz. H_2SO_4 und $SbCl_3$ waren identisch mit denjenigen des authentischen Hellebrigenins³¹). — Die Acetylverbindung XIX kristallisierte aus An in zu Rosetten vereinigten Blättchen, Smp. 229—247° (Zers. und Sintern ab 212°). $[\alpha]_D^{25} = +36,1^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,537$ in Chl).

Substanz D = Desacetyl-cinobufotalin (XI). Die mit Chl-Me 99:1 gewonnenen Fraktionen gaben nach dem Eindampfen und Verflüssigen des Rückstandes mit An Kristalle, die nach zweimaligem Umlösen aus Me-Ä in farblosen Prismen erhalten wurden, die bei 251—261° (Zers., Sint. ab 178°) schmolzen. Substanz D ist in Chl äusserst schwer löslich. $[\alpha]_D^{20} = +33,6^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 0,8857$ in Me). Zur Analyse: 5 Std. bei 60° und 0,02 Torr getrocknet (Schweinchen).

$C_{24}H_{34}O_6$	Ber. C 68,99	H 8,04	O 22,97%
(418,51)	Gef. „ 68,87	„ 8,19	„ 23,65%

Im UV. zeigte Substanz D ein Maximum bei 295 $m\mu$ ($\log \epsilon = 3,72$). Die Farbreaktionen sind in Tab. 3 und 4 im theoret. Teil wiedergegeben.

Acetylverbindung der Substanz D = Acetyl-cinobufotalin (XIII). 142 mg Substanz D (XI) wurden in 2 cm^3 Pyridin gelöst, mit 1,4 cm^3 Acetanhydrid versetzt und 14 Std. bei 35° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 184 mg Rohprodukt, das nach zweimaligem Umlösen aus An-Ä 112 mg farblose Prismen vom Smp. 211—216° (Sint. ab 206°) lieferte. Die Mischprobe mit dem aus Cinobufotalin erhaltenen Acetyl-cinobufotalin (Smp. 215—218° Sint. ab 208°) schmolz bei 208—217° (Sint. ab 204°). $[\alpha]_D^{20} = +24,2^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,0638$ in Chl)³²) bzw. $[\alpha]_D^{25} = +10,1^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 0,7337$ in Me). Die Färbungen mit konz. H_2SO_4 waren ebenfalls identisch mit authentischem Acetyl-cinobufotalin (XIII). Auch die IR.-Spektren waren völlig identisch.

Substanz E. Während die ersten beiden Fraktionen mit Chl-Me 49:1 nur amorphes Material lieferten, liess sich aus den beiden nachfolgenden Fraktionen in kleinen Mengen eine kristallisierte Substanz gewinnen, die vorläufig als Substanz E bezeichnet wird. Sie gab nach dem Umlösen aus Me Nadeln und nach zweimaligem Umkristallisieren aus An

³¹) J. Schmutz, Helv. 32, 1442 (1949). Wie früher³), besonders p. 234, schon festgehalten worden war, geben alle Bufogenine und ihre Acetylverbindungen mit Tetranitromethan eine deutliche Gelbfärbung. Diese Reaktion ist somit zum Unterschied von den einfach ungesättigten Fünfringlaktone des Digitalis- und Strophanthus-Typs zum Nachweis von Kerndoppelbindungen bei Steroiden, die den α -Pyroneering tragen, nicht brauchbar. Auch Hellebrigenin und seine Acetylverbindung geben, in wenig Chl gelöst, eine deutliche Gelbfärbung. (Wenn J. Schmutz, Pharmac. Acta Helv. 22, 373 (1947) [siehe besonders p. 379 oben] und P. Lelogeais, De l'extrait parotoidien du crapaud commun, thèse de doctorat de l'Université de Lille, 1956 [siehe besonders p. 48] keine Gelbfärbung beobachten konnten, so ist dies darauf zurückzuführen, dass jeweils zu wenig Substanz für diese Probe eingesetzt wurde.)

³²) Früher³) wurde $[\alpha]_D^{17} = +23,8^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (in Chl) gefunden.

Blättchen mit starkem Seidenglanz vom Smp. 232—237°. Die Substanz E ist in Chl sehr schwer löslich. $[\alpha]_D^{25} = -2,7^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,815$ in Me). Zur Analyse: 4 Std. bei 60° und 0,02 Torr getrocknet.

$C_{27}H_{46}O_3$ (418,64) Ber. C 77,46 H 11,08% Gef. C 77,56 H 11,55%
 $C_{27}H_{46}O_3$ (420,65) Ber. „ 77,09 „ 11,50%

Die in üblicher Weise bereitete Acetylverbindung von E gab nach chromatographischer Reinigung an Al_2O_3 und zweimaligem Umlösen aus Me-Ä lange dünne Nadeln vom Smp. 149—157°. $[\alpha]_D^{25} = -37^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,6926$ in Me). Zur Analyse: 4 Std. bei 60° und 0,02 Torr getrocknet.

$C_{31}H_{52}O_5$ (504,73) Ber. C 73,76 H 10,39% Gef. C 73,30 H 10,54%
 $C_{31}H_{50}O_5$ (502,71) Ber. „ 74,06 „ 10,03%

Verteilungschromatographien.

Verteilungschromatographie I. Die mit Chloroform erhaltenen Fraktionen der zuletzt erwähnten Al_2O_3 -Chromatographie (Isolierung der Substanzen A, B, C, D und E), aus denen z. T. kristallisiertes Telocinobufagin gewonnen werden konnte und die auf Grund der Papierchromatographie noch 2 weitere als Substanz A und B bezeichnete Bufogenine enthielten, wurden vereinigt und wie folgt der Verteilungschromatographie unterworfen: 1,5 kg gereinigtes *Hyflo Super Cel* mit 1,5 kg Propylenglykol-Wasser-Gemisch 4:1 gleichmässig durchfeuchtet und gesiebt, in Bz-Chl-Gemisch 1:1 suspendiert und in kleinen Portionen in eine Säule (Nr. 4)³³⁾ eingefüllt und leicht festgestampft. Das Bufogenin-Gemisch (5,8 g) wurde in der eben nötigen Menge Propylenglykol-Wasser-Gemisch 4:1 gelöst, mit der gleichen Gewichtsmenge (wie Propylenglykol-Wasser) *Hyflo*

Tabelle 7.

Verteilungschromatographie I.

Fraktionsnummern	Benzol-Chloroform	Menge in Litern	Menge in mg	Ergebnisse der Papierchromatographie
1—18	50:50	15,0	1478	Amorphes Gemisch: Cinobufagin, Bufalin, Bufotalin, Cinobufotalin und Gamabufotalin.
19—25	50:50	6,5	565	Amorphes Gemisch: Telocinobufagin und zunehmende Mengen A = Desacetyl-cinobufagin. Fraktion 21 wurde acetyliert (siehe Text).
26—30	45:55	4,4	439	Wenig Telocinobufagin und viel A = Desacetyl-cinobufagin = Verteilungschromatographie II.
31—46	40:60	15,7	1255	Amorphes Gemisch: wenig Telocinobufagin, viel A = Desacetyl-cinobufagin und wenig B = Desacetyl-bufotalin.
47—56	30:70 bis 20:80	9,6	474	Amorphes Gemisch: viel A = Desacetyl-cinobufagin und wenig B = Desacetyl-bufotalin, vereinigt und acetyliert (siehe Text).
57—65	10:90	8,2	236	Amorphes Gemisch: A = Desacetyl-cinobufagin, B = Desacetyl-bufotalin und wenig Hellebrigenin.
Total			44,47 g	

³³⁾ H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein, *Helv.* **36**, 357 (1953).

Super Cel verrieben und direkt (ohne im Lösungsmittel zu suspendieren) auf die vorbereitete Säule gegeben und wiederum leicht festgestampft. Die Durchlaufgeschwindigkeit des Eluierungsmittels — das jeweils vor dem Aufgiessen mit Propylenglykol-Wasser 4:1 gesättigt worden war — wurde auf 70–80 cm³ pro Std. einreguliert; die Menge der einzelnen Fraktionen betrug 700–1000 cm³. Die einzelnen Fraktionen wurden im Vakuum eingedampft, die Rückstände in Chl gelöst und dieses zur Entfernung von Propylenglykol-Resten mit Wasser geschüttelt und nach dem Trocknen über Na₂SO₄ verdampft. In Tab. 7 sind die Ergebnisse dieses Verteilungschromatogramms zusammengestellt.

Die Fraktionen 1–18 waren amorph und stellten auf Grund der Papierchromatographie ein Gemisch von Cinobufagin, Bufalin, Bufotalin, Cinobufotalin und Gamabufotalin dar. Die Fraktionen 19–25 waren ebenfalls amorph und enthielten auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen nur Telocinobufagin und Substanz A = Desacetyl-cinobufagin (III). Dieses liess sich durch Acetylierung von Fraktion 21 verifizieren: das rohe Acetylierungsprodukt wurde an Al₂O₃ chromatographiert. Die erste dabei eluierte Substanz (Smp. 198–201°) erwies sich nach Smp., Mischprobe, spez. Drehung und Farbreaktionen als identisch mit Acetyl-cinobufagin (V). Die zweite Substanz (Smp. 262–275°) war auf Grund derselben Kriterien identisch mit Acetyl-telocinobufagin (XVII). — Die Fraktionen 26–30, aus denen ebenfalls keine Kristalle gewonnen werden konnten, enthielten nach Papierchromatographie viel A = Desacetyl-cinobufagin und wenig Telocinobufagin. Sie wurden vereinigt und einer erneuten Verteilung (siehe Verteilungschromatographie II) unterworfen. — Von Fraktion 31 weg liess sich im Papierchromatogramm neben wenig Substanz A und Telocinobufagin Substanz B (= Desacetyl-bufotalin (VIII)) in steigender Menge nachweisen. — Fraktion 47 und folgende waren gemäss Papierchromatographie frei von Telocinobufagin und enthielten nur die beiden Substanzen A und B.

Acetylierung von 170 mg der vereinigten Fraktionen 47–56. Das nach üblicher Acetylierung erhaltene Rohprodukt zeigte im Papierchromatogramm das Vorliegen von Acetyl-cinobufagin und Acetyl-bufotalin. Chromatographie an Al₂O₃ lieferte rund 100 mg (roh) Acetyl-cinobufagin und rund 30 mg (roh) Acetyl-bufotalin. Letzteres gab nach Umlösen aus An-Ä rhombische Plättchen, die bei 259–265° (Zers. und Sint. ab 252°) schmolzen und im Gemisch mit authentischem Acetyl-bufotalin keine Depression zeigten. $[\alpha]_D^{20} = +4,0^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (in Chl).

Verteilungschromatographie II. Die vereinigten Fraktionen 26–30 (= 439 mg) der Verteilungschromatographie I wurden wie folgt einer erneuten Verteilung unterworfen: 200 g gereinigtes *Hyflo Super Cel* wurden mit 150 g Formamid (Sdp. = 77–78° bei 1 Torr) durchgearbeitet, in einem Gemisch von Bz-Chl 6:4 suspendiert und portionenweise in eine Säule (Nr. 1²⁶) eingefüllt und nach Sedimentation sorgfältig festgestampft, wobei eine Schichthöhe von 60 cm resultierte. Die zu verteilende Substanz wurde in 5 cm³ Formamid gelöst mit 10 g *Hyflo Super Cel* verrieben, auf der Säule festgestampft und mit einer kleinen Schicht reinem *Hyflo* überdeckt. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 6 cm³ pro Std. Die Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen wurde in genau gleicher Weise durchgeführt wie im oben beschriebenen Verteilungschromatogramm. In der folgenden Tab. 8 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Aus den vereinigten Fraktionen 14–29, die nach Papierchromatogramm eine einzige Substanz enthielten, konnten 83 mg rohe Kristalle von Telocinobufagin isoliert werden, die nach zweimaligem Umlösen aus Me kurze, dicke Prismen vom Doppel-Smp. 148°/197–203° lieferten; $[\alpha]_D^{20} = +4,7^{\circ} \pm 3^{\circ}$ (c = 1,069 in Chl). — Fraktionen 30–35 waren Gemische, die amorph blieben. — Fraktionen 36–46 gaben im Papierchromatogramm einen einzigen Flecken und enthielten entsprechend dem Ergebnis der Acetylierung (siehe unten) nur Substanz A = Desacetyl-cinobufagin, die aber nicht in Kristallen gewonnen werden konnte.

Acetylierung: 45 mg amorphes, papierchromatographisch einheitliches Desacetyl-cinobufagin wurde in 1 cm³ Pyridin und 0,7 cm³ Essigsäure gelöst und 45 Std. bei 40° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 48 mg Rohprodukt, das nach Chromatographie an Al₂O₃ nur das bekannte Acetyl-cinobufagin (Smp. 195–198°, Mischprobe ebenso; $[\alpha]_D^{21} = -2^{\circ} \pm 2^{\circ}$ in Chl) gab.

Tabelle 8.

Verteilungschromatographie II. 439 mg Gemisch von Telocinobufagin und Desacetyl-cinobufagin.

Frak-tions-Nr.	Eluierungs-mittel	Menge in mg	Ergebnis	Papier-chromatographie
1—13	Bz-Chl 6:4	71	gelbes Öl	—
14—29	Bz-Chl 6:4	100	83 mg Kristalle = Telocinobufagin	T
30—35	Bz-Chl 6:4	16	amorph, Gemisch	T + A
36—46	Bz-Chl 6:4	235	amorph, reines Desacetyl-cinobufagin	A
Total		422		
T = Telocinobufagin; A = Desacetyl-cinobufagin.				

Desacetylierung von Cinobufagin (IV). 1,0 g Cinobufagin vom Smp. 210—212° wurde in 80 cm³ Me gelöst, mit einer Lösung von 1,125 g KHCO₃ in 37,5 cm³ H₂O versetzt und bei 20° stehengelassen. Nach 5 Tagen wurde mit verd. HCl gegen Lackmus neutralisiert, im Vakuum vom Me befreit, der wässrige Rückstand mit Chl extrahiert, dieses über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand gab nach Chromatographie an Al₂O₃ 866 mg papierchromatographisch einheitliches Desacetyl-cinobufagin. Dieses liess sich nicht zur Kristallisation bringen. $[\alpha]_D^{25} = +26,5^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,172 in Chl). Im Papierchromatogramm zeigte es dieselben Rf-Werte wie Substanz A aus Ch'an Su.

Acetylierung von Desacetyl-cinobufagin (III). 74 mg amorphes durch Chromatographie an Al₂O₃ gereinigtes Desacetyl-cinobufagin wurden in üblicher Weise acetyliert. Das dunkelgefärbte rohe Acetylierungsprodukt (85 mg) wurde über 2,5 g Al₂O₃ filtriert. Aus An-Ä farblose lange, zu Büscheln vereinigte Nadeln vom Smp. 198—201°. Misch-Smp. mit authentischem Acetyl-cinobufagin: 198—200°.

Desacetylierung von Bufotalin (IX). 500 mg Bufotalin wurden in 55 cm³ Me gelöst, mit einer Lösung von 750 mg KHCO₃ in 25 cm³ Wasser versetzt und bei 20° stehengelassen. Nach 5 Tagen wurde mit verd. HCl gegen Lackmus neutralisiert, im Vakuum vom Me befreit, der wässrige Rückstand mit Chl extrahiert, dieses über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde an 15 g Al₂O₃ chromatographiert. Das mit Bz-Chl-Gemischen und reinem Chl eluierte Material (ca. 70%) war unveränderte Ausgangssubstanz. Die Fraktionen mit Chl-Me-99:1 blieben amorph. Die mit Chl-Me 49:1 abgelöste Substanz (ca. 8%) liess sich kristallisieren. Die Kristalle waren äusserst schwer löslich in Chl, Me und An und gaben nach dem Umlösen aus Me längliche Prismen, die bei 210—223° (Sint. ab 195°) schmolzen. $[\alpha]_D^{19} = +30^\circ \pm 3^\circ$ (c = 1,039 in Dioxan). Im Papierchromatogramm zeigten sie dieselben Rf-Werte wie Substanz B aus Ch'an Su. Zur Analyse 4 Std. bei 80° und 0,02 Torr getrocknet (Schweinchen).

C₂₄H₃₄O₅ (402,51) Ber. C 71,61 H 8,51% Gef. C 70,17 H 9,04%

Acetylierung von Desacetyl-bufotalin (VIII). 25 mg Desacetyl-bufotalin vom Smp. 195—223° wurden in üblicher Weise acetyliert. Das dunkel gefärbte rohe Acetylierungsprodukt wurde über 1 g Al₂O₃ filtriert. Aus An-Ä farblose rhombische Plättchen vom Smp. 258—263° (Sint. ab 245°). Misch-Smp. mit Acetyl-bufotalin: 256—262° (Sint. ab 245°). $[\alpha]_D^{19} = +4,4^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,946 in Chl); $[\alpha]_D^{20} = -2,1^\circ \pm 3^\circ$ (c = 1,029 in Dioxan).

Die Analysen wurden im Mikrolabor (Leitung E. Thommen) der Organisch-Chemischen Anstalt der Universität Basel ausgeführt.

Zusammenfassung.

Mit Hilfe des chromatographischen Aufteilungsverfahrens an Al_2O_3 und durch Papierchromatographie liessen sich im Chloroform-extrakt eines neuen Handelsmusters von Ch'an Su 11 Bufogenine nachweisen, wovon 10 in reiner Form präparativ herausgearbeitet werden konnten, während das elfte (Substanz B = Desacetyl-bufotalin) nur auf indirektem Wege (durch Verseifung von Bufotalin) rein erhalten werden konnte. Die einzelnen Bufogenine waren im untersuchten Ch'an-Su-Muster in folgenden Mengen enthalten (bezogen auf die rohe Droge): Cinobufagin 4,2–4,5 %, Resibufogenin (roh) 1,7–2 %, Bufalin 1,25–1,5 %, Cinobufotalin 1,0 – 1,2 %, Gamabufotalin 0,85 bis 1,0 %, Bufotalin 0,6–0,8 %, Telocinobufagin 0,5–0,6 %, Substanz A = Desacetyl-cinobufagin 0,3–0,4 %, Substanz C = Hellebrigenin 0,17–0,2 %, Substanz D = Desacetyl-cinobufotalin 0,12–0,15 %, Substanz B = Desacetyl-bufotalin 0,10 – 0,15 %.

Die 4 in dieser Arbeit als Substanzen A, B, C und D bezeichneten Bufogenine sind zum ersten Mal im Ch'an Su aufgefunden worden.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

144. Versuche zur Aufklärung der Fettsäurebildungen bei Mikroorganismen

von Karl Bernhard, Leo Abisch und Heribert Wagner.

Herrn Prof. Dr. T. Reichstein zum 60. Geburtstag gewidmet.

(29. V. 57.)

Für die Bildung der Fettsäuren in der Pflanze wurden zahlreiche Reaktionsmechanismen in Betracht gezogen¹⁾. In bezug auf die Dynamik solchen Geschehens darf man wohl annehmen, nicht alle in den Zellen nachweisbaren Fettsäuren entstünden darin gleichzeitig und in von Anfang an feststehenden Verhältnissen bzw. Mengen. Es ist vielmehr denkbar, Verbindungen mit besonderer funktioneller Bedeutung würden im Verlaufe des Wachstums zuerst gebildet, andere indessen erst in einem späteren Zeitpunkte in Erscheinung treten.

Frühere Untersuchungen liessen erkennen, dass der in Glucose-lösung leicht kultivierbare und ein gut abtrennbares Mycel produzierende Schimmelpilz *Phycomyces Blakesleeanus* Lipide von vielseitiger

¹⁾ T. P. Hilditch, Nature **167**, 298 (1951); Ann. Rev. Biochemistry **22**, 128 (1953); Oléagineux **10**, 83 (1955). — T. P. Hilditch, The Chemical Constitution of Natural Fats, London, S. 468 (1947).