

Zur Kenntnis der Krötengiftstoffe. X.

Die Konstitution des Bufothionins;

von *Heinrich Wieland* und *Theodor Wieland*.

Mit 1 Figur im Text.

[Aus dem Chem. Laboratorium der Bayer. Akademie der Wissenschaften in München.]

(Eingelaufen am 6. Februar 1937.)

Der verbreitetste, im Hautsekret der meisten untersuchten Kröten aufgefundene basische Giftstoff, das *Bufotenin* $C_{12}H_{16}ON_2$ ist als 5-Oxy-N-dimethyl-tryptamin (I) erkannt worden. Sein häufiger Begleiter, das *Bufotenidin* erwies sich als sein Methylbetain¹⁾. Für eine dritte Base, die in Bindung mit Schwefelsäure vorkommt und die als *Bufothionin* bezeichnet wurde, steht die Konstitutionsermittlung noch aus. Sie ist zuerst aus dem Hautsekret einer japanischen Kröte, von *Bufo gama*, isoliert worden²⁾. Später hat man sie auch in der südamerikanischen Art *Bufo arenarum* aufgefunden³⁾, und wir verdanken Prof. V. Deulofeu in Buenos Aires das reichliche Material, das die Ausführung der vorliegenden Untersuchung erlaubte. In der Zwischenzeit haben Jensen und Chen⁴⁾ Bufothionin auch im Hautsekret von *Bufo marinus* und in der chinesischen Droge Chan' Su (Senso) aufgefunden.

Bufothionin ist eine vollkommen neutrale Substanz, die sich weder in Säuren noch in Alkalien löst und auch geringe Löslichkeit in Wasser besitzt. Schon beim kurzen Erwärmen mit verdünnten Mineralsäuren, nicht aber mit

¹⁾ A. 513, 1 (1934). Andere Basen aus exotischen Kröten, die von Jensen u. Chen isoliert und als andersartige Verbindungen angesehen wurden, sind jetzt von den gleichen Autoren [J. biol. Chem. 116, 86 (1936)] im Einklang mit unsrer Annahme (a. a. O., S. 8) als identisch mit Bufotenin bzw. Bufotenidin erkannt worden.

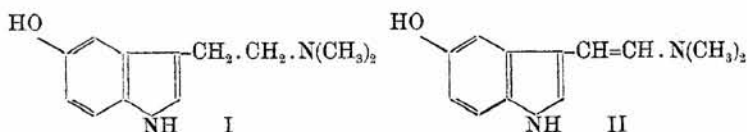
²⁾ H. Wieland u. F. Vocke, A. 481, 216 (1930).

³⁾ H. Wieland, W. Konz u. H. Mittasch, A. 513, 1 (1934).

⁴⁾ J. biol. Chem. 116, 87 (1936).

Alkali, spaltet sie, wie schon früher festgestellt wurde, Schwefelsäure ab und bildet das Salz einer Base $C_{12}H_{14}ON_2$, die sich in der Zusammensetzung um 2 H-Atome vom Bufotenin unterscheidet. Wie dieses gibt sie die auf phenolisches OH hindeutende blaue Färbung mit Eisenchlorid und gleichermaßen auch die Indolreaktion nach Hopkins-Cole. So lagen deutliche Anhaltspunkte für einen nahen strukturellen Zusammenhang der beiden Basen vor.

Geht man von dieser Annahme als Arbeitshypothese aus, faßt man das Spaltprodukt des Bufothionins als Dehydro-bufotenin auf, so erhebt sich die Frage, in welcher Weise man sich die Dehydrierung des Bufotenins (I) zu denken hat.



Vom gleichen Grundgerüst läßt sich nur die Formel II mit ungesättigter Seitenkette ableiten. Jedoch hatte man auch, bei geringfügiger Umgruppierung, mit der Möglichkeit des Auftretens eines zweiten heterocyclischen Ringes, wie er beim Eserolin bekannt ist, zu rechnen.

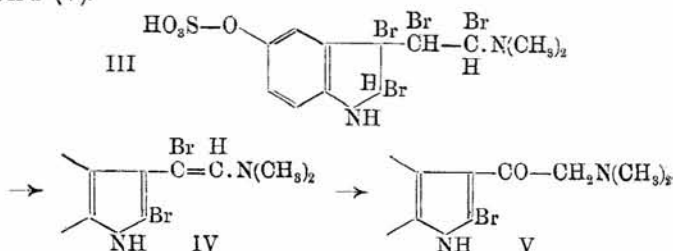
Dieser Möglichkeit war umso mehr Beachtung zu schenken, als frühere Versuche, Dehydrobufotenin — so wollen wir die Spaltbase des Bufothionins nennen — zu Bufotenin zu hydrieren, ohne Ergebnis geblieben waren.

Es wurde zuerst festgestellt, daß der basische Stickstoff in der Dehydrobase von tertiärer Natur ist. Man führte mit Methyljodid und Thalliumäthylat die erschöpfende Methylierung aus und gelangte so zum Jodmethylat der am Phenolhydroxyl methylierten Base. Der energische Abbau dieses Jodmethylats in der Kalischmelze verlief anders als bei der analogen Verbindung aus Bufotenin. Während hierbei Trimethylamin abgespalten wird, bleibt in der Reihe der Dehydrobase der basische Stickstoff der Molekel erhalten: Man erhält in guter Ausbeute den *Methyläther des Dehydrobufotenins* $C_{13}H_{16}ON_2$.

Die Oxydation mit Permanganat, die an sich bei Indol-derivaten wenig Aussicht hat, versprach im Falle der Gültigkeit von Formel II für Dehydrobufotenin eine Auskunft über das Endstück der ungesättigten Kette. Zwar wurde das erwartete N-Dimethylformamid nicht isoliert, wohl aber seine Spaltung zu *Dimethylamin* und *Ameisensäure* bewerkstelligt.

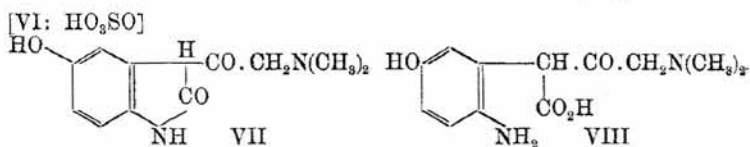
Auf Grund dieser auf die Richtigkeit von Formel II hinweisenden Reaktionen wurde der Abbau des Bufothionins mit Brom in Angriff genommen. Die von Schwefelsäure befreite Base und ihre Abkömmlinge reagieren mit Brom in unübersichtlicher Weise. Dagegen verbraucht Bufothionin in wäßriger Lösung unter den im Versuchsteil beschriebenen Bedingungen genau 2 Mole Brom. Das Reaktionsprodukt, das noch mit Schwefelsäure verestert ist, hat die Zusammensetzung $C_{12}H_{13}ON_2BrSO_4$. Es ist also nur 1 Brom substituierend eingetreten, außerdem ist die Verbindung um 1 Sauerstoffatom reicher als Dehydrobufotenin. 3 Bromatome wurden als Br' in der Reaktionslösung bestimmt.

Dieser Reaktionsverlauf läßt sich sehr gut auf Grund der Formel II deuten: Die 4 Bromatome lagern sich zuerst an die beiden Doppelbindungen, an die der Seitenkette und an die des Indolkerns an (III). Unter Abspaltung von 2HBr kommt es zur Bildung eines Dibrom-Substitutionsprodukts (IV), aus dem nun ein Brom hydrolytisch abgespalten wird (V).



Auch das in den Kern eingetretene Brom läßt sich durch ganz schwache Säure, durch Einleiten von Kohlendioxyd in die erhitzte Lösung von V hydrolytisch entfernen,

ohne daß es zur Abspaltung der Schwefelsäure kommt. Man erhält so die bromfreie Verbindung $C_{12}H_{14}O_2N_2SO_4$, die die Farbreaktion des Indols nicht mehr gibt. Man kennt in einigen Beispielen das Verhalten bromsubstituierter Indole, aus denen die hydrolytische Abspaltbarkeit des Halogens unter der Wirkung verdünnter Säuren hervorgeht¹⁾. Bildung und Eigenschaften der bromfreien Substanz legen für sie die Konstitution eines Oxindol-Derivates (VI) nahe.



Die Schwefelsäure läßt sich mit verdünnter Bromwasserstoffsäure entfernen und man gewinnt so das Oxindol-Derivat VII, das wieder intensive Farbreaktion mit Eisenchlorid gibt. Es wurde als Bromhydrat isoliert. Die Spaltung von V zu VII läßt sich bei Anwendung von verdünnter Säure auch in einer Operation durchführen.

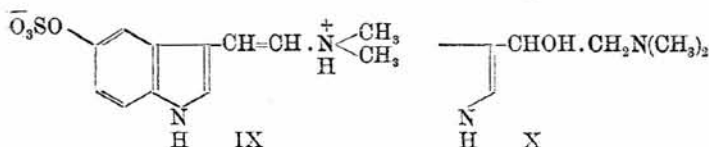
Daß in VII ein Abkömmling des Oxindols vorliegt, wurde bewiesen durch die Aufspaltung des Ringes mit Alkali, die unter strengem Luftausschluß geschehen muß. Die offene Säure läßt sich diazotieren und als Diazoniumverbindung mit β -Naphthol zu einem Farbstoff kuppeln. Durch Mineralsäuren wird sie der Erwartung gemäß leicht wieder zu VII cyclisiert.

Es ist auffallend, daß es nicht gelingt, die Säure VIII, die eine substituierte Acetessigsäure darstellt, durch kräftige Einwirkung von Alkali der Säurespaltung oder mit Säuren der Ketonspaltung zu unterwerfen. Wir haben uns vergeblich bemüht, auf dem ersten Wege Dimethylamino-essigsäure zu erhalten; meist blieb das Material unverändert. Dies mag mit der Substitution des Methyls durch die basische Gruppe $-N(CH_3)_2$ zusammenhängen. Wir finden nirgends Angaben über basische Acetessigester der vorliegenden Konstitution.

¹⁾ Mazzara u. Borgo, G. 35, 563 (1906).

Nachdem die bisher geschilderten Ergebnisse durchaus im Sinne der Formulierung II für Dehydro-bufotenin verwertet werden konnten, wurden die Versuche zur katalytischen Hydrierung der Base erneut aufgenommen, unter Verwendung einer zur genauen Bestimmung der Wasserstoffaufnahme geeigneten Apparatur, die sich an die von R. Kuhn und Möller¹⁾ angegebene anlehnt, und die im Versuchsteil beschrieben ist. Bei der Hydrierung in basischer oder neutraler Lösung waren auch jetzt wieder die Versuche erfolglos. Dagegen gelang es, in schwach salzsaurer Lösung mit der theoretisch notwendigen Menge Wasserstoff Dehydrobufotenin in *Bufotenin* überzuführen und damit die Konstitution des Bufothionins vollkommen sicher zu stellen. Die Identität der hydrierten Base mit Bufotenin wurde bewiesen durch den Vergleich der Jodmethyle und der 3 Pikrate, die sich vom Bufotenin ableiten. Von diesen Pikraten, an deren Bearbeitung sich Dr. W. Konz beteiligt hat, wird nachher noch kurz die Rede sein.

Auf Grund der somit festgelegten Konstitution erscheint Bufothionin als das innere Salz einer Phenylschwefelsäure mit der stark basischen Dimethylaminogruppe gemäß Formel IX. Seine Unlöslichkeit in Säuren und Alkalien ist begründet durch den polaren Ausgleich der beiden



gleichstarken Ionen und durch seine geringe Löslichkeit in Wasser. Die Veresterung der Phenolgruppe findet ihr biologisches Vorbild in der Phenylschwefelsäure und im Harnindican. Die ungesättigte basische Seitenkette des Bufothionins liegt in der Grundform im *Neurin* $\text{CH}_2=\text{CHN}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$ vor. Ein anderes biogenes Amin dieser Struktur ist unseres

¹⁾ Z. Ang. 47, 145 (1934). Näheres vgl. Dissert. Th. Wieland, München 1937.

Wissens nicht bekannt. Bei den Beziehungen zwischen Neurin und Cholin wird man das Bufothionin zu dem Alkamin X, dessen Synthese wir vergeblich versucht haben, in einen physiologischen Zusammenhang zu bringen suchen.

Damit würde es wahrscheinlicher, daß Bufotenin durch Hydrierung von Bufothionin in der Zelle sich bildet, als daß die beiden Substanzen im umgekehrten Sinne in gegenseitiger Beziehung stehen.

Über die Pikrate des Bufotenins.

Vom Bufotenin sind 2 Pikrate beschrieben worden¹⁾, ein rotes und ein gelbes. Das rote Pikrat wandelt sich bei 140° in das gelbe um, die beiden haben daher den gleichen Schmelzpunkt von 178°. Vor 2 Jahren haben Hoshino und Shimodaira²⁾ das Bufotenin synthetisch dargestellt und durch ein rotes Pikrat vom Schmelzp. 177° bis 178° identifiziert. Dieses rote Pikrat ist ein *Dipikrat* und die beiden Autoren sind der Meinung, daß es mit dem von uns beschriebenen roten Pikrat vom gleichen Schmelzpunkt identisch sei. Diese Vermutung trifft aber nicht zu, da unser rotes Pikrat auf Grund der Analyse ein *Monopikrat* ist. Wir haben das Dipikrat von H. und Sch. bei Anwendung eines Überschusses von Pikrinsäure ebenfalls erhalten. Kocht man das Dipikrat in Benzol, so wird 1 Mol Pikrinsäure herausgelöst und man erhält das gelbe Monopikrat. Krystallisiert man es aus bicarbonathaltigem Wasser um, so kann man das rote Monopikrat gewinnen, wie auch umgekehrt die beiden Monopikrate mit Pikrinsäure zum Dipikrat umgewandelt werden können. Damit sind die Verhältnisse geklärt: Es existieren 3 Pikrate des Bufotenins, die zufällig etwa den gleichen Schmelzpunkt³⁾ besitzen.

Beschreibung der Versuche.

Die Isolierung des Bufothionins aus den getrockneten Häuten von *Bufo arenarum* geschah nach der bereits für das gleiche Material aus *Bufo gama jap.* beschriebenen Methode. Ebenso wurde das Chlorhydrat der Spaltbase so wie früher beschrieben bereitet.

Nitrosamin des Dehydrobufotenins. Wir fügen von dem nach der ebenfalls schon beschriebenen Methode dargestellten Nitrosamin die noch fehlende C,H-Bestimmung bei:

¹⁾ H. Wieland, G. Hesse u. H. Mittasch, B. 64, 2099 (1931).

²⁾ A. 520, 21 (1935).

³⁾ Bei der Nachbearbeitung der Pikrate haben sich geringfügige Unterschiede in den Schmelzpunkten gegenüber den früheren Werten ergeben. Vgl. Versuchsteil.

3,696 mg Subst. (0,073 mg Rückstand, als K_2CO_3 ber.): 6,960 mg CO_2 , 1,74 mg H_2O .

$C_{12}H_{18}O_2N_2 \cdot HCl$ (267,5)	Ber. C 53,63	H 5,22
	Gef. „ 52,36	„ 5,37.

Pikrat. Darstellung durch Versetzen der heißen wäßrigen Lösung des Dehydrobufotenin-chlorhydrats mit heißer wäßriger Pikrinsäurelösung. Gelbe Nadeln, die nach dem Umkrystallisieren aus schwach angesäuertem Wasser bei 186° schmelzen.

Schon früher hat W. Konz, Dissertation München 1934, aus den Mutterlaugen der Isolierung des Bufotenins aus den Häuten von *Bufo arenarum* ein Pikrat vom Schmelzp. 145° isoliert, das neben Dehydrobufotenin-pikrat vom Schmelzp. 186° auch bei späteren Aufarbeitungen erhalten wurde. Es geht beim längeren Kochen mit Mineralsäuren und beim Schmelzen in die höherschmelzende Modifikation über.

Darstellung der freien Base.

900 mg Dehydrobufotenin-chlorhydrat¹⁾ werden in 20 ccm abs. Alkohol mit 27 ccm einer 0,127 n-absolut alkoholischen Lösung von Thalliumäthylat versetzt. Die vom Thalliumchlorid-Niederschlag abzentrifugierte Lösung scheidet nach weitgehendem Einengen das Dehydrobufotenin in schönen 6-eckigen Blättchen ab. Schmelzp. 199° (unter Zers.) nach dem Umkrystallisieren aus Wasser, aus Alkohol bei 218° . Der Unterschied ist auf die Bindung von Krystall-Lösungsmittel zurückzuführen.

4,278 mg Subst. (aus Wasser): 9,645 mg CO_2 , 2,74 mg H_2O . —
3,472 mg Subst.: 0,384 ccm N_2 (20° , 724 mm).

$C_{12}H_{14}ON_2 + 1\frac{1}{2}H_2O$ (229)	Ber. C 62,8	H 7,42	N 12,25
	Gef. „ 62,4	„ 7,24	„ 12,28.

Erschöpfende Methylierung.

Man löst das Dehydrobufotenin-chlorhydrat in absolutem Alkohol und versetzt mit absolut alkoholischer Thalliumäthylatlösung bis zur eben alkalischen Reaktion. Dann wird ein Überschuß von Methyljodid zugefügt und am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Wenn, nach etwa 5–10 Minuten, die Lösung wieder neutral reagiert, wird neuerdings alkalisch gemacht und, wenn die alkalische

¹⁾ Analyse: $C_{12}H_{14}ON_2 \cdot HCl$ Ber. C 56,74 H 6,58
Gef. „ 56,50 „ 6,63.

Reaktion wiederum verschwunden ist, diese Prozedur solange wiederholt, bis die Lösung längere Zeit alkalisch bleibt (nach etwa 2 Stunden). Nun wird mit neuem Methyljodid bis zum Verschwinden der basischen Reaktion weitergekocht, vom gelben Niederschlag abzentrifugiert, dieser 2-mal mit absolutem Alkohol ausgekocht und die gesamte Lösung im Exsiccator eingedunstet. Der krystallisierte Rückstand schmilzt nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol bei 208°. Ausbeute 60 Proc.

4,408, 4,232 mg Subst.: 7,630, 7,310 mg CO₂, 2,19, 2,10 mg H₂O. —
4,030 mg Subst.: 2,69 mg AgJ.

C ₁₄ H ₁₉ ON ₂ J (358)	Ber. C 47,0	H 5,3	OCH ₃ 8,66
	Gef. „ 47,21, 47,11	„ 5,56, 5,55	„ 8,82.

Pikrat. Herstellung wie bei Dehydrobufotenin-pikrat beschrieben. Dunkelgelbe und rote Nadeln vom Schmelzp. 103—104°. Bei der katalytischen Hydrierung des Jodmethylats in Wasser mit PtO₂ wird nur Ausgangsmaterial zurückerhalten.

Spaltung des Jodmethylats in der Ätzkalischmelze.

150 mg des Jodmethylats werden fein gepulvert und in der Reibschale mit etwa 1 g Kaliumhydroxyd innig vermischt. Das Gemisch wird dann der Hochvakuumdestillation unterworfen. Bei 160° gehen 80 mg eines farblosen Öls über, das sofort krystallisiert. Da Umkrystallisationsversuche aus jedem Lösungsmittel erfolglos waren, wurde in Äther gelöst, von den unlöslichen Verunreinigungen filtriert und der Äther verdunsten gelassen. Schmelzp. 58 bis 59°. Ausbeute 77 mg.

4,457 mg Subst.: 11,930 mg CO₂, 3,07 mg H₂O. — 3,465 mg Subst.
0,402 ccm N₂ (22°, 720 mm).

C ₁₃ H ₁₆ ON ₂ (216)	Ber. C 72,3	H 7,40	N 12,95
	Gef. „ 73,0	„ 7,71	„ 12,73.

Acetylierung des Dehydrobufotenins (bearbeitet von W. Konz).

Beim kurzen Aufkochen des Dehydrobufotenin-chlorhydrats mit Essigsäureanhydrid erhält man nach dem Abdampfen des Lösungsmittels i. V. ein Acetylprodukt, das nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol und wenig Wasser bei 265° unter Zers. schmilzt. Von ihm

liegt keine Analyse vor, doch dürfte es sich um das Monoacetylprodukt handeln.

Diacetyl-dehydrobufotenin. Nach 2-stündigem Kochen des Chlorhydrats mit Essigsäureanhydrid färbt sich die Lösung tief grün. Das Anhydrid wird i. V. abdestilliert und der krystalline Rückstand aus Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt 140—141°.

4,317, 4,362, 4,326 mg Subst.: 10,540, 10,590, 10,550 mg CO₂,
2,23, 2,28, 2,33 mg H₂O. — 3,599 mg Subst.: 0,352 ccm N₂ (20°, 711 mm).



Ber. C 67,0

H 6,29

N 9,8

Gef. „ 66,59, 66,21, 66,51 „ 5,78, 5,86, 6,03 „ 10,05.

Oxydation von Bufothionin.

Bei der Einwirkung von $\frac{n}{10}$ -Permanganatlösung in schwach schwefelsaurer Lösung werden rund 20 Äquivalente Sauerstoff verbraucht. Es wird vom abgeschiedenen Braunstein abfiltriert und die gelbliche Lösung mit Äther extrahiert. Die wäßrige Lösung wird sodann mit Schwefelsäure angesäuert und zur Verseifung von entstandenem Dimethylformamid 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht und darauf auf $\frac{1}{4}$ abdestilliert. Das schwach saure Destillat wird mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und mit wenig Silbernitratlösung erhitzt. Ein dunkler Niederschlag von Silber zeigt *Ameisensäure* an.

Der saure Destillationsrückstand wird mit konz. Natronlauge stark alkalisch gemacht und unter Vorlage eines mit Salzsäure beschickten Pélignet-Rohres weitgehend eingedampft. Die vorgelegte Säure hinterläßt nach dem Abdampfen den krystallinen Rückstand eines Amin-chlorhydrats, das zur Untersuchung auf das flüchtige Amin unter Vorlage einer gemessenen Menge $\frac{n}{100}$ -HCl alkalisch destilliert wird.

Amin aus 1,904 mg Chlorhydrat: 2,52 ccm, ber. für *Dimethylamin* 2,34 ccm $\frac{n}{100}$ -KOH.

Auch Form und Farbe der Anlagerungsverbindung desamins an Dinitronaphthol¹⁾ weist auf *Dimethylamin* hin.

Brom-abbau des Bufothionins.

Gelber Bromkörper (V). 1 g Bufothionin wird in Portionen von 50 mg in jeweils 5 ccm Wasser heiß gelöst. Die Lösung wird sofort in einer Aceton-Kohlensäure-Kältemischung

¹⁾ G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse IV, 247.

eingefroren, wobei kein Bufothionin auskrystallisiert. Dann gibt man eisgekühltes Bromwasser bis zum Bestehenbleiben der gelben Farbe rasch zu und taut das Eis mit der Hand von außen auf. Die gelbe klare Lösung scheidet nach kurzem Kratzen mit dem Glasstab den Bromkörper in prachtvollen gelben, eckigen Blättchen ab. Gesamtausbeute 1,18 g. Schmelzp. $186,5^{\circ}$ (unter Zers.).

4,770 mg Subst.: 6,705 mg CO_2 , 1,480 mg H_2O . — 4,168 mg Subst.: 0,273 ccm N_2 (21°, 715 mm). — 10,875 mg Subst.: 5,245 mg AgBr.

$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OBrSO}_4$ (377)

Ber. C 38,10 H 3,44 N 7,42 Br 21,2

Gef. „ 38,39 „ 3,47 „ 7,16 „ 20,5.

Die Bestimmung des aufgenommenen Broms ergab in allen Fällen den Verbrauch von 4 Atomen Brom auf 1 Mol Bufothionin, z. B.:

25,35 mg Subst.: 0,87 ccm 0,412 n-Bromwasser.

Ber. für 4 Äquivalente Brom 0,88 ccm.

Der gelbe Bromkörper ist in keinem Lösungsmittel löslich. Fichtenspan-reaktion und Hopkins-Cole-Reaktion negativ.

Entbromung des Bromkörpers (VI). 50 mg der Bromverbindung werden in 1 ccm Wasser unter Durchleiten von CO_2 bis zur Lösung erwärmt. Beim Abkühlen erscheinen farblose Krystalle, die aus Wasser umkrystallisiert werden. Schmelzp. $171\text{--}172^{\circ}$ unter Zers. Fichtenspan-reaktion und Reaktion auf Halogen negativ, Reaktion auf Schwefelsäure in der Kälte ebenfalls.

Abspaltung der Schwefelsäure (VII).

1. *Mit methylalkoholischer Salzsäure.* Etwa 100 mg der bromfreien Substanz (VI) wurden mit methylalkoholischer Salzsäure einige Minuten gekocht, das Lösungsmittel wurde auf dem Wasserbad verdampft. Der ölige Rückstand wurde in Methanol gelöst und mit Äther gefällt. Die farblose Schmiere krystallisiert nach dem Abgießen des Methanol-Äther-Gemisches bald. Sie kann nach dem Aufschlänmen mit absolutem Alkohol abgesaugt werden. Schmelzp. 241° (unter Zers.). Das Produkt ist äußerst leicht in Wasser löslich. Fichtenspanreaktion und Sulfatreaktion negativ, Eisenchloridreaktion blau.

4,164 mg Subst.: 7,925 mg CO_2 , 2,11 mg H_2O . — 3,722 mg Subst.: 0,333 ccm N_2 (21°, 712 mm).

$C_{12}H_{14}O_3N_2 \cdot HCl$ (270,5)	Ber. C 53,1	H 5,55	N 10,3
	Gef. „ 52,4	„ 5,72	„ 9,73.

2. Mit Bromwasserstoffsäure. 100 mg des bromfreien Schwefelsäureesters (VI) werden mit 1 ccm 4 n-Bromwasserstoffsäure 5 Minuten zum Sieden erhitzt. Beim Erkalten scheiden sich gelbe Krystalle ab, die aus Wasser umkrystallisiert werden. Schmelzp. $210-211^{\circ}$ (unter Zers.).

Das gleiche Bromhydrat wird auch aus dem gelben Bromkörper (V) direkt erhalten: 2,2 g werden mit 5 ccm Wasser, das mit 10 Tropfen 3 n-Bromwasserstoffsäure angesäuert ist $\frac{1}{4}$ Stunde am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Darauf wird mit Barytwasser die entstandene Schwefelsäure quantitativ entfernt und die gelbe saure Lösung im Exsiccator eingengt, bis sich reichlich gelbe Krystalle ausscheiden. Ausbeute 1,45 g = 78 Proc. d. Th.

5,030 mg Subst. (bei 60° i. Hochv. getr.): 8,285 mg CO_2 , 2,92 mg H_2O . — 3,447 mg Subst.: 0,259 ccm N_2 (25° , 760 mm).

$C_{12}H_{14}N_2O_3 \cdot HBr$ (315)	Ber. C 45,7	H 4,76	N 8,90
	Gef. „ 45,03	„ 5,09	„ 8,61.

Barytspaltung des Bromhydrats VII.

100 mg des Oxindolderivats VII werden in 1,5 ccm kalt gesättigten Barytwassers unter Durchleiten eines luftfreien Stickstoffstroms 5 Minuten zum Kochen erhitzt. Dabei färbt sich die Reaktionslösung sofort dunkelbraun. Aus der dunklen Lösung fällt man durch Einleiten von Kohlendioxyd das Barium aus, wobei auch die offene Aminosäure (VIII) sich gleichzeitig abscheidet. Sie wird durch verdünnte Essigsäure vom Bariumcarbonat befreit und aus Wasser umkrystallisiert. Schmelzp. 218° (unter Zers.), Ausbeute 20 Proc.

4,201 mg Subst. (bei 70° i. Hochv. getr.): 8,235 mg CO_2 , 2,52 mg H_2O . — 3,722 mg Subst.: 0,348 ccm N_2 (21° , 720 mm).

$C_{12}H_{16}O_3N_2$ (270)	Ber. C 53,40	H 6,64	N 10,39
	Gef. „ 53,46	„ 6,71	„ 10,28.

Die Substanz gibt nach dem Diazotieren mit alkalischer β -Naphtollösung tiefe Rotfärbung. Die gleiche Probe fällt mit dem Ausgangsmaterial negativ aus. Eisenchloridreaktion

mit der offenen Säure negativ (wohl infolge von Oxydation am Benzolkern).

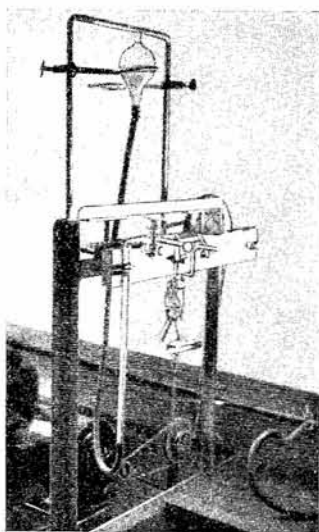
Beim kurzen Aufkochen des Spaltungsprodukts mit 2 n-Bromwasserstoffsäure erhält man nach dem Eindunsten im Exsiccator Krystalle, die nach dem Umkrystallisieren aus Wasser bei 209—210° unter Zers. schmelzen und sich mit dem Oxindolderivat (VII) als identisch erweisen. Eisenchloridreaktion tiefblau.

Katalytische Hydrierung des Dehydrobufotenin-chlorhydrats.

Die katalytische Hydrierung erfolgt in einer Apparatur, die bei Anwendung des von R. Kuhn und Möller beschriebenen Gefäßes gestattet, die Substanz durch Kippen erst nach Abhydrierung des Katalysators zu diesem ins Lösungsmittel zu bringen. Um Wasserstoffverluste durch Diffusion zu vermeiden, ist die Meßbürette direkt über einen Dreiweghahn an das Hydriergefäß angeschmolzen und wird mitgeschüttelt (vgl. Figur). Als Sperrflüssigkeit dient Wasser.

30 mg reinstes Dehydrobufotenin-chlorhydrat werden in 4 ccm Wasser, das mit ein paar Tropfen 2 n-Salzsäure angesäuert ist und mit PtO_2 als Katalysator bis zur Aufnahme der einer Doppelbindung entsprechenden Menge Wasserstoff (2,8 ccm) hydriert. Dann wird vom Katalysator abfiltriert und im Exsiccator auf $\frac{1}{3}$ des Volumens eingeeengt.

Die schwach gelbliche Lösung wird nun heiß mit einem ziemlichen Überschuß einer heiß gesättigten wäßrigen Pikrinsäurelösung versetzt. Beim Erkalten scheidet sich ein schmutzig rotes Pikrat aus, das öfters aus schwach säurehaltigem Wasser umkrystallisiert wird, wonach es den Schmelzp. 174° erreicht. Der Mischschmelzpunkt mit einem



in gleicher Weise aus krystallisiertem Bufotenin erhaltenen roten *Dipikrat* (Schmelzp. 174—175°) liegt bei 174°.

Gelbes Bufotenin-monopikrat. Eine Probe des roten Bufotenin-dipikrats wird unter gutem Reiben mit dem Glasstab so lange mit Benzol gekocht, bis alles in ein gelbes Pulver übergegangen ist. Dieses wird aus Wasser umkrystallisiert. Schmelzp. 180—181° (frühere Angabe 178°).

Auf gleiche Weise wird aus dem aus dem Hydrierungsprodukt des Dehydrobufotenins erhaltenen roten Pikrat ein gelbes vom Schmelzpunkt 180—181° gewonnen. Mischschmelzpunkt beider 180°.

Rotes Bufotenin-monopikrat. Beim Umkrystallisieren des roten Dipikrats aus bicarbonathaltigem Wasser wird ein rotes Pikrat vom Schmelzp. 180° erhalten, das sich beim Erhitzen über 140° in ein gelbes umwandelt. Das rote Monopikrat der bei der Hydrierung erhaltenen Base wird auf gleiche Weise erhalten. Schmelzp. 177,5°, nach Umwandlung in das gelbe bei 140°. Mischschmelzpunkt beider roten Monopikrate 178°.

Jodmethyolat. 20 mg des roten Dipikrats werden in salzsaurer Lösung bis zum Verschwinden jeglicher Farbe am Perforator mit Äther ausgezogen. Die farblose salzsaure Lösung wird dann mit Barytwasser alkalisch gemacht und aus ihr durch 50-stündiges Perforieren mit Äther die Base extrahiert. Die Ätherlösung wird mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und dann nach weitgehendem Einengen mit ein paar Tropfen Methyljodid versetzt. Über Nacht scheidet sich ein weißer flockiger Niederschlag aus, der aus Wasser umkrystallisiert wird. Weiße Prismen vom Schmelzp. 216—217°. Das aus der Methanolösung des natürlichen Bufotenins durch Versetzen mit Methyljodid krystallinisch abgeschiedene Jodmethyolat schmolz bei 209—210°. Nach dem Umkrystallisieren aus Wasser liegt auch sein Schmelzpunkt bei 217,5°.

Mischschmelzpunkt beider Jodmethyolate 217,5°. Damit ist die Identität der hydrierten Base mit Bufotenin sichergestellt.