

332. Heinrich Wieland, Gerhard Hesse und Heinz Mittasch: Über basische Inhaltsstoffe des Hautsekrets der Kröte¹⁾.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayr. Akad. d. Wissenschaften zu München.]

(Eingegangen am 3. August 1931.)

Neben den stickstoff-freien Lactonen des Hautsekrets der Kröte (Bufotalin, Bufagin u. a.) scheint von den meisten Bufo-Arten eine Kombination dieser wohl den Gallensäuren nahestehenden Verbindungen mit Suberylarginin im Bufotoxin und analog gebauten Substanzen erzeugt zu werden. Aber auch basische, alkaloid-ähnliche Stoffe sind im Hautdrüsen-Sekret, und zwar von Bufo vulgaris, angetroffen worden, zuerst von Bertrand und Phisalix²⁾ in chemisch nicht näher definierter Form. Erst 1920 hat H. Handovsky³⁾ die von Bertrand und Phisalix als Bufotenin bezeichnete Base in Gestalt mehrerer krystallisierter Salze isoliert. Aus Analyse und Molekulargewichts-Bestimmung wird die Formel C_6H_9NO abgeleitet. Da die Base die Fichtenspan-Reaktion der Pyrrole liefert, stellt Handovsky mit Vorbehalt für sein Bufotenin die Formel I auf, die durch das Ergebnis einer Methylimid-Bestimmung gestützt erscheint. Im vorigen Jahre haben H. Jensen und K. K. Chen⁴⁾ aus „Senso“, dem eingetrockneten Hautsekret der chinesischen Kröte, eine Base als Pikrat isoliert, die sie dessen Schmp. nach mit dem Bufotenin von Handovsky für identisch ansehen.

Wir hatten bei der Verarbeitung größerer Mengen ausgedrückten Drüsensekrets, das G. Hesse in diesem Frühjahr beschafft hatte, die Möglichkeit, die basischen Bestandteile genauer zu untersuchen. Nach Entfernung aller sauren und neutralen Begleitstoffe machte man den wäßrigen Auszug schwach alkalisch, entzog ihm im Perforator mit Äther die Hauptmenge an basischen Substanzen und gewann durch Fällen mit Pikrinsäure zwei schön krystallisierte Pikrate, die sich durch die Farbe — das eine ist rot, das andere gelb — scharf, im Schmelzpunkt jedoch nicht unterscheiden. Zudem lassen sie sich unter Bedingungen, die nachher angegeben werden, wechselseitig ineinander überführen. Bei erhöhter Temperatur ist das gelbe Pikrat die stabile Form, denn das rote lagert sich bei etwa 140° in das gelbe um. Die Lösungsfarbe der beiden Salze ist, den Farben im festen Zustand entsprechend, deutlich verschieden. Deshalb kann keine Dimorphie vorliegen. Nach längerem Stehen haben Lösungen von gleicher Konzentration denselben Farbton angenommen, ein Beweis dafür, daß ein Lösungs-Gleichgewicht eingetreten ist.

Die freie Base haben wir bis jetzt nicht in krystallisiertem Zustand erhalten, dagegen ihr prachtvoll krystallisiertes Jodmethylat. Aus den Analysen des Pikrats und des Jodmethylats hat sich für Bufotenin die Formel $C_{14}H_{18}O_2N_2$ ableiten lassen, die sich hinsichtlich des Prozentgehalts an den einzelnen Elementen nicht unwesentlich von der Formel Handovskys unterscheidet. Die Base enthält nur ein ausgesprochen basisches Stickstoffatom, da sie nur ein Mol. Methyljodid aufnimmt. Die quartäre Ammoniumbase, die wegen ihrer stark reduzierenden Wirkung nicht mit Silberoxyd, sondern mit Thalliumhydroxyd dargestellt wurde, spaltet beim Erhitzen, in Gegenwart von Luft (-Sauerstoff) bereits in der Kälte, Trimethyl-

1) V. Mitteilung über Kröten-Giftstoffe.

2) Compt. rend. Soc. Biologie 1893, 477; ebenda 1902, 278.

3) Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 86, 138 [1920].

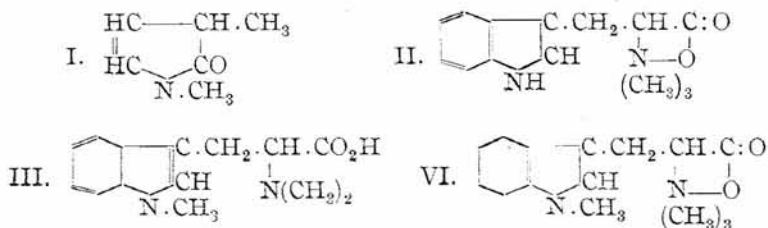
4) Journ. biol. Chem. 87, 741 [1930].

amin ab. Der verbleibende Rest, der noch starke Fichtenspan-Reaktion gibt, hat den Charakter einer Säure angenommen.

Die quartäre Ammoniumbase läßt sich in ein sehr schön krystallisiertes Pikrat überführen, und dieses Pikrat erwies sich als identisch mit dem gleichartigen Salz einer Base, die H. Mittasch aus dem chinesischen Senso, von dem bereits oben die Rede war, isoliert hatte. Diese Base aus Senso, die wir als Bufotenidin bezeichnen, wird ihrer jetzt aufgeklärten Natur gemäß der wäßrigen Lösung durch Äther nicht entzogen. Ihre Isolierung erfolgte mit Hilfe des schön krystallisierten Flavianats.

Bufotenin enthält 2 Methylgruppen am tertiären Stickstoff. Bringen wir die Bestandteile dieser Dimethylamino-Gruppe von der Formel in Abzug, so bleibt ein Rest von $C_{12}H_{12}O_2N$, aus dem wir, wegen der sauren Natur des Spaltungsproduktes im Versuch des Hofmannschen Abbaus, eine Carboxylgruppe herauslösen können. Dann sieht man, daß der geringe Wasserstoffgehalt dazu führt, einen oder 2 ungesättigte, und zwar aromatische oder heterocyclische, Ringe im Bufotenin anzunehmen. Doppelbindungen olefinischer Art scheinen nicht vorhanden zu sein, da auch nachdrückliche Hydrierungsversuche die quartäre Ammoniumbase unverändert ließen.

Der Frage nach der Konstitution des Bufotenins sind wir, wie wir glauben, sehr nahe gekommen durch den Inhalt einer Arbeit von van Romburgh und Barger⁵⁾, in der die Synthese einer merkwürdigen, aus den Samen des javanischen Baumes *Erythrina Hypaphorus*, Boerl. von M. Greshoff isolierten Base, des Hypaphorins, beschrieben wird. Dieses Hypaphorin hat die Zusammensetzung $C_{14}H_{18}O_2N_2$, dieselbe also wie Bufotenin, und ist identisch mit dem Betain des Tryptophans (II). Von Bufotenin ist Hypaphorin jedoch verschieden; Bufotenin ist ja als tertiäre Base erkannt worden.



Die typischen Merkmale des Indol-Kerns, wie auch die reduzierenden Eigenschaften sind in den basischen Derivaten von Pflanze und Tier unverkennbar die gleichen. Wenn man Bufotenidin längere Zeit mit starker Lauge kocht, tritt deutlich und unverkennbar Indol-Geruch auf. Das Auftreten der beiden Pikrate und ihre gegenseitigen Beziehungen, die zu Anfang so rätselhaft erschienen, klären sich ohne weiteres, wenn wir den nicht basischen Stickstoff in einen Indol-Ring verlegen. Das rote Pikrat trägt danach die Pikrinsäure am Indol-Stickstoff, daher seine tiefere Farbe, das gelbe Pikrat leitet sich von der tertiären Amino-säure ab. Mit steigender Temperatur dissoziiert die Pikrinsäure von der weniger basischen Indol-Seite zum tertiären Stickstoff hinüber.

⁵⁾ Journ. chem. Soc. London **99**, 2068 [1911].

⁶⁾ Medd. Lands Plantentuin **7**, 29 [1890]. Diese Zeitschrift war uns leider nicht zugänglich.

Vergleicht man die beiden Betaine Hypaphorin und Bufotenidin in der Zusammensetzung, so erweist sich die Base aus der Kröte als homolog der pflanzlichen; ihre Molekel ist um CH_2 größer. Unsere Versuche, die Konstitution der tierischen Basen aufzuklären, haben eine Lücke, da wir über die Natur der vorliegenden Homologie nichts Sicheres aussagen können. Aber man wird, ehe die Fortsetzung der Arbeit die noch ausstehende Klärung gebracht hat, wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen dürfen, daß im Bufotenin und Bufotenidin der Indol-Stickstoff methyliert ist. Damit käme man für die beiden Basen zu den Formeln III und IV.

Beschreibung der Versuche.

I. Über Bufotenin (G. Hesse).

Darstellung: Das getrocknete Sekret von *Bufo vulgaris* wird in ähnlicher Weise, wie dies für die Giftstoffe der japanischen Kröte beschrieben worden ist⁷⁾, aufgearbeitet. Die dabei anfallenden wäßrigen Lösungen werden bei saurer Reaktion durch Extraktion mit Äther im Perforator von allen gelösten nicht-basischen Bestandteilen befreit. Dann wird mit Soda deutlich alkalisch gemacht und die Extraktion mit neuem Äther 2 Tage lang fortgesetzt. Die Äther-Lösung der Base wird mit Natriumsulfat getrocknet.

Eine Probe dieser Lösung wurde mit ätherischer Oxalsäure gefällt. Das Oxalat ließ sich aus Aceton-Äther umkrystallisieren. Gut ausgebildete Krystalldrusen vom Schmp. $93-94^\circ$, wie ihn auch Handovsky angibt. Das Oxalat verändert sich beim Aufbewahren unter Rotfärbung.

Die Pikrate: Die Hauptmenge der Äther-Lösung wird mit ätherischer Pikrinsäure versetzt, wobei das rote und gelbe Pikrat nebeneinander auskrystallisieren. Bisweilen gelingt es, zuerst das gelbe Pikrat zu erhalten, nach dessen Entfernung das rote auskrystallisiert. Es ist nicht schwer, die beiden Pikrate von einander zu trennen. Man findet für beide den Schmp. bei 178° (Handovsky: 168° , Jensen und Chen: 166°). Das rote Pikrat wird bei 140° gelb.

Krystallisiert man aus Wasser um, so erhält man aus dem gelben Pikrat ein Gemisch der roten und gelben Krystalle. Das rote Salz bildet lange Nadeln, das gelbe kurze Prismen. Aus heißer 1-proz. Sodalösung werden nur die roten Nadeln erhalten. Aus Alkohol läßt sich das gelbe Salz unverändert umkrystallisieren; setzt man aber der Lösung eine Spur Salzsäure zu, so kommt das rote Pikrat heraus. Beide Pikrate behielten beim Trocknen im Vakuum bei 100° ihr Gewicht; sie enthalten also kein Lösungsmittel gebunden.

3.314 mg gelbes Pikrat: 0.436 ccm N (22° , 719 mm). — 3.365 mg rotes Pikrat: 0.448 ccm N (24° , 714 mm).

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7\text{N}_3$ (475). Ber. N 14.73. Gef. N 14.40, 14.38.

Um die freie Base zu gewinnen, wird das Pikrat — gleichgültig, welches von beiden — durch wenig stark verdünnte Natronlauge in Lösung gebracht und die Lösung im Apparat mit Äther erschöpfend extrahiert. Die mit Kaliumcarbonat getrocknete Äther-Lösung hinterläßt nach dem Abdunsten des Lösungsmittels einen schwach gelb gefärbten, harzigen Rückstand, der gegen Curcuma und Lackmus alkalisch reagiert. Die Base ist in Wasser wenig löslich, leicht in Alkohol und in Äther, aus wäßrigen Säuren mit Wasserdampf nicht flüchtig und spaltet auch beim Kochen mit Natronlauge, in der sie ebenfalls löslich ist, kein flüchtiges Amin ab. Ein in die Lösung ge-

⁷⁾ A. 481, 221ff. [1930].

brachter, mit konz. Salzsäure benetzter Fichtenholz-Span färbt sich nach kurzer Zeit intensiv violettrot. Diese Färbung wird vom Dampf der siedenden Lösung nicht hervorgerufen. Die Lösung in Eisessig wird von wenig Nitrit intensiv rot gefärbt.

Jodmethyolat: Aus der getrockneten Äther-Lösung scheidet sich nach Zugabe eines Überschusses von Methyljodid nach kurzem Stehen das quartäre Jodid in harziger Form ab. Es läßt sich aus wenig Methanol zu schönen, farblosen Drusen krystallisieren, die bei 209° unzersetzt schmelzen. In Wasser ist das Jodmethyolat ziemlich leicht löslich.

Beim Trocknen im Vak. bei 100° keine Gewichtsabnahme. — 4.482 mg Sbst.: 7.51 mg CO_2 , 2.21 mg H_2O . — 3.875 mg Sbst.: 0.248 ccm N (21° , 724 mm).

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_2$ (388). Ber. C 46.38, H 5.45, N 7.22. Gef. C 45.70, H 5.52, N 7.08.

Schüttelt man die wäßrige Lösung des Jodmethyolats mit Silberoxyd, scheidet sich alsbald ein Silberspiegel ab, und die Lösung färbt sich tief braunrot; gleichzeitig tritt starker Trimethylamin-Geruch auf. Mit Thalliumhydroxyd läßt sich das quartäre Salz unzersetzt entjoden, aber nur bei Ausschluß von Luft gelingt es, die Abspaltung von Trimethylamin zu vermeiden. In Wasserstoff tritt erst bei 160° eine Veränderung ein, bei der Trimethylamin abgetrennt wird.

Diese Base wurde in 2-n. Salzsäure aufgefangen und als Goldsalz identifiziert. Schmp. 240° .

5.243 mg Sbst.: 2.548 mg Au. — $\text{N}(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{AuCl}_4\text{H}$. Ber. Au 49.4. Gef. Au 48.6.

Als Rückstand der thermischen Zersetzung blieb eine poröse Masse, die, in Wasser unlöslich, von verd. Alkalien aufgenommen wurde. Sie zeigte, nach dem Auswaschen mit Wasser, saure Reaktion gegen Lackmus und gab noch starke Pyrrol-Reaktion. Beim Kochen mit Alkalien trat deutlich reiner Indol-Geruch auf.

Aus der wäßrigen Lösung der quartären Base fällt Pikrinsäure ein rotes Pikrat, das, aus Wasser umkrystallisiert, bei 198° schmolz und durch Misch-Schmp. mit dem nachstehend beschriebenen Pikrat des Bufotenidins identisch war. — Brachte man dieses Pikrat mit verd. Schwefelsäure in Lösung, so ließ sich mit Flaviansäure ein in langen Nadeln krystallisierendes, rotes Salz vom Zers.-Pkt. um 200° erhalten, das sich von dem Flavianat jener Base in nichts unterschied.

II. Über Bufotenidin (H. Mittasch).

Der uns durch das Entgegenkommen von Prof. T. Shimizu-Okayama zugänglich gewordene Haut-Extrakt der chinesischen Kröte (Senso) wurde in fein gepulvertem Zustand mit Äther, dann mit Alkohol extrahiert. Der erschöpfte Rückstand wurde mit sehr verdünnter Schwefelsäure ausgekocht, das Filtrat versetzte man heiß mit einer wäßrigen Lösung von Flaviansäure. Beim Erkalten scheidet sich langsam ein rotes krystallinisches Salz ab. Man erhält dieses Flavianat in schönen Nadeln, wenn man das Rohprodukt unter Luft-Ausschluß in ganz verdünnter Natronlauge löst und in der Hitze mit verd. Schwefelsäure ansäuert. Zers.-Pkt. bei 200° . Das Flavianat gibt intensive Pyrrol-Reaktion. Kocht man die alkalische Lösung bei Luft-Zutritt, wird viel Trimethylamin abgespalten. Beim Eindampfen der Lösung tritt deutlicher Indol-Geruch auf.

Pikrat: Die Base läßt sich ihrer wäßrigen Lösung nicht durch Extraktion entziehen. Man zersetzte das Flavianat mit Bariumacetat, dampfte im Vakuum

zur Trockne ein und trennte die freie Base durch Auskochen des Rückstandes mit Alkohol vom Bariumflavianat ab. Der noch wenig Flaviansäure enthaltende und daher gelb gefärbte alkohol. Auszug wurde wieder eingedampft, die wäßrige Lösung des Rückstandes setzte man mit Pikrinsäure um, die in roten Nadeln ein Pikrat fällte. Aus Alkohol oder Wasser umkrystallisiert, zeigte es den Schmp. 198°, wie das Pikrat der quartären Ammoniumlase von Bufotenin.

3.718 mg Sbst.: 7.04 mg CO₂, 1.58 mg H₂O. — 3.273 mg Sbst.: 0.434 ccm N (19°, 724 mm).

C₁₅H₂₀O₂N₂, C₆H₃O₇N₃ (489). Ber. C 51.57, H 4.70, N 14.31.

Gef. „ 51.64, „ 4.76, „ 14.77.

Das Bufotenidin findet sich auch in den wäßrigen Lösungen aus *Bufo vulgaris*, denen das Bufotenin mit Äther entzogen worden ist. Die Base ist von Handovsky bereits bemerkt, aber nicht charakterisiert worden. Offenbar sind die beiden Basen in den daraufhin untersuchten Krötenhaut-Extrakten nebeneinander enthalten, denn Jensen und Chen haben aus *Senso* zweifellos Bufotenin isoliert. Es ist noch nicht festgestellt, an welche Säure die beiden Tryptophan-Derivate gebunden sind. Vielleicht ist es Korksäure, die wir mehrfach in unseren Präparaten angetroffen haben.

Es sei noch bemerkt, daß niemals ein gelbes Pikrat des Bufotenidins neben dem roten beobachtet worden ist. Dies steht in bester Übereinstimmung mit der oben geäußerten Auffassung über die Struktur der beiden isomeren Bufotenin-Pikrate. Das Bufotenidin kann nur am Indol-Stickstoff Pikrinsäure aufnehmen, da der quartäre Stickstoff durch Betain-Bildung abgesättigt ist.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sei für Unterstützung der Untersuchung bestens gedankt.
