

## Benzoylierung des 4-Methyl-4'-nitro-desoxybenzoin.

2.5 g des Ketons wurden in 70 ccm Aceton gelöst und dazu 20 ccm 2-n. Natronlauge gegeben. Bei der Zugabe von 4 g Benzoylchlorid zu der tief violetten Lösung erfolgte fast augenblicklich Entfärbung. Nach 2-maligem Hinzufügen von noch je 20 ccm 2-n. Natronlauge blieb die Violettfärbung bestehen. Nun wurde mit Schwefelsäure angesäuert und der dabei als halb feste Masse ausgeschiedene Niederschlag aus Äthanol und verschiedene Male aus wäbr. Aceton umgelöst. Gelbe Blättchen vom Schmp. 159—160°. Wie die Analyse zeigte, konnte die Benzoylverbindung nicht ganz frei von Keton erhalten werden.

0.0262 g Sbst.: 0.0695 g CO<sub>2</sub>, 0.0113 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>32</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N. Ber. C 73.5, H 4.7. Gef. C 72.4, H 4.8.

### 213. Georg Hahn und Marie Elisabeth Fernholz: Über das Bienengift, V. Mittel.\*): Eine einfache, chemische Trennung der beiden Giftkomponenten.

[Aus d. Institut für Organ. Chemie d. Universität Frankfurt a. M.]  
(Eingegangen am 22. Mai 1939.)

Hahn und Ostermayer (l. c.) hatten beobachtet, daß durch Erhitzen die krampferregende Wirkung des Bienengiftes verloren geht, und nur eine, das Atemzentrum lähmende Wirkung erhalten bleibt. Die Frage, ob diese Wirkungen zwei verschiedenen Substanzen zugeordnet werden können oder ob es sich um die Spaltung eines einheitlichen Moleküls in zwei Bruchstücke handelt, konnte von Hahn und Leditschke in der III. Mitteilung im Sinne der ersten Annahme entschieden werden. Die fraktionierte Dialyse vorgereinigter Bienengiftlösungen ergab, daß die krampferregende Komponente (Komponente I) eine rasch dialysierende, mithin niedrig molekulare Substanz ist, die auf Grund dieser Eigenschaft von der nur schwer dialysierenden Komponente II abtrennbar ist. Da die zunächst für nichtdialysabel gehaltene Komponente II — wenn auch nur sehr langsam — ebenfalls durch die Membran hindurchgeht, wie Hahn und Leditschke in der IV. Mitteilung gezeigt haben, konnte die Trennung durch Dialyse keinen Anspruch erheben, quantitativ zu sein. Wenn trotzdem im Tierversuch nur die eine Wirkung zu beobachten war, so lag das daran, daß bei der Komponente I die heftigen Krämpfe die Wirkung der Komponente II nicht erkennen ließen, andererseits waren bei der Komponente II die Konzentrationen so hoch, daß das Tier verendete, bevor die geringen Mengen noch beigemischter Komponente I Krämpfe auslösen konnten. Obwohl die einzelnen Dialysate also die beiden toxischen Komponenten nicht frei voneinander enthalten konnten, zeigte sich doch ein wesentlicher Unterschied im chemischen Verhalten, so daß sich ein besseres Trennungsverfahren darauf aufbauen ließ. Versetzt man nämlich die wäßrige Lösung von Dialysat 1, 2, 3 oder 4 mit 2-n. Natronlauge,

\*) I. Mittel.: Gg. Hahn u. H. Ostermayer, B. **69**, 2407 [1936]; II. Mittel.: Gg. Hahn u. H. Leditschke, B. **69**, 2764 [1936]; III. Mittel.: G. Hahn u. H. Leditschke, B. **70**, 681 [1937]; IV. Mittel.: Gg. Hahn u. H. Leditschke, B. **70**, 1637 [1937].

so bleibt sie — von geringfügigen Trübungen abgesehen — klar. Die letzten Dialysate aber, die hauptsächlich Komponente II enthalten, geben mit Alkali eine voluminöse Fällung. Hieraus kann geschlossen werden, daß Komponente I entweder eine leicht wasserlösliche Base oder aber — was weiter unten erhärtet werden wird — eine Substanz mit Säurecharakter sein muß, während Komponente II basischer Natur ist. Hierauf eine Trennung zu begründen schien nicht schwer, sofern das angewandte Trennungsmittel sich in der Kälte leicht wieder entfernen ließ. Es war daher naheliegend, Ammoniak zu verwenden.

Schon Langer<sup>1)</sup> hatte beobachtet, daß aus Bienengiftlösungen mit Ammoniak Flocken ausgefällt wurden, die giftig waren. Er nahm daher an, das Bienengift sei „eine organische Base, die mit Alkalien, besonders Ammoniak, ausfällt, allgemeine Alkaloidreaktionen gibt und unzerstörbar ist bei Einwirkung von trockner und feuchter Hitze“. Da er — wie wir heute wissen — nur die hitzebeständige, mit Ammoniak ausfällbare Komponente II in Händen hatte, ist seine Beobachtung zwar richtig, aber seine Aussage zu weitgehend, denn die Komponente I ist durchaus hitzeunbeständig, wie bereits in der III. Mitteilung gezeigt wurde. Langer übersah ferner, daß diese Fällung nur dann quantitativ ist, wenn man erstens sehr konzentrierte, wäßrige Lösungen benutzt, und zweitens mit Ammoniakgas bei 0° sättigt. Die Komponente II kann dann abzentrifugiert werden, während sich die Komponente I durch Eindampfen der ammoniakalischen Lösung im Hochvakuum-Verdampfer bei Zimmertemperatur ammoniakfrei gewinnen läßt.

Wenn man von vorgereinigtem 60-proz. Alkoholextrakt nach Hahn und Ostermayer ausgeht, dann stellt die so gewonnene Komponente II ein fast farbloses, amorphes Pulver dar, dessen Haltbarkeit zeitlich anscheinend unbegrenzt ist. Es löst sich in Wasser praktisch nicht, leicht dagegen in verdünnten Säuren. Die gebräuchlichsten Eiweißreaktionen, wie die Biuretreaktion, die Fällung mit Pikrinsäure, Salpetersäure, Alkohol, Natriumchlorid und Essigsäure fallen mit dieser Substanz positiv aus. Die physiologische Untersuchung der Komponente II, die in dem Laboratorium der Forapinwerke, H. Mack Nachf., Ulm a. d. D., ausgeführt wurde, zeigte, daß sie die hämolytische, gewebescheidende und toxische Wirkung noch besitzt, und nur die krampferregende Wirkung fehlt.

Die Komponente I wird nach dem Abdampfen des Ammoniaks als schwach bräunlicher Lack erhalten, der lackmussauer reagiert, in Wasser spielend löslich ist und eine starke Giftigkeit besitzt, wenn man schnell gearbeitet hat und sofort prüft. Läßt man aber die so gewonnene Komponente I länger stehen, so beobachtet man eine ständige Abnahme der Wirksamkeit, die nach 10—14 Tagen bereits völlig verschwunden ist. Die oben angeführten Eiweißreaktionen fallen mit der rohen Komponente I negativ aus. Löst man die rohe Komponente II in verdünnter Ameisensäure und wiederholt die Ammoniakfällung, so zeigt sich, daß diese unter den geschilderten Bedingungen quantitativ reproduzierbar ist. Bei der Untersuchung der Dialysate der III. und IV. Mitteilung ergab sich, daß tatsächlich auch schon in den zuerst durch die Membran hindurchdiffundierenden Giftmengen ein beträchtlicher Teil Komponente II enthalten war, der erst jetzt vollständig von der Kom-

<sup>1)</sup> J. Langer, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 38, Heft 5/6 [1897]; Arch. Pharmacodyn., Vol. VI [1899].

ponente I abgetrennt werden konnte. Die Zerlegung des Bienengiftes mit Ammoniak in der angegebenen Weise stellt somit die erste quantitative Trennung der beiden Giftkomponenten dar.

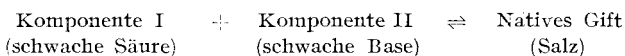
Auf Grund der Carletschen<sup>2)</sup> Angabe, wonach der Giftapparat der Hymenopteren aus zwei Drüsen bestehen soll, deren eine, die Giftdrüse, ein stark saures, die andere — die glandula sebacea — ein schwach alkalisches Sekret liefere, haben wir, in der Annahme, daß es sich hier um die beiden Komponenten handeln könne, in unserer IV. Mitteilung eine Zuordnung vorgenommen. Die nur in Säuren lösliche Komponente II könnte dann nur aus der Giftdrüse stammen, während die schwach saure Komponente I u. U. als alkalisch reagierendes Salz von der glandula sebacea sezerniert würde. Diese Annahme bedarf natürlich noch des experimentellen Beweises, der durch Herauspräparieren der beiden Drüsen und Nachprüfung ihres Sekretes erbracht werden müßte. Denn es ist ebensogut möglich, daß die Giftdrüse bereits das fertige Gift erzeugt, das ja — dank vorhandener freier Ameisensäure — ebenfalls sauer reagiert, während die andere Drüse Begleitstoffe, wie z. B. Histamin u. a. bilden könnte. Untersuchungen, die der Zoologe E. Müller auf der Bienenfarm Illertissen der Fa. H. Mack Nachf., Ulm a. d. D. am Giftapparat der Biene durchführte, brachten keine Bestätigung der Carletschen Angabe.

Die weitere Untersuchung der Eigenschaften der beiden Komponenten ergab die Feststellung, daß zwar Komponente II mit Pikrinsäure ein in Wasser praktisch unlösliches Pikrat bildet, Komponente I dagegen kein Pikrat zu bilden imstande ist. Wir haben deshalb den Versuch gemacht, die beiden Komponenten auch über die Pikrate zu trennen. Es zeigte sich aber, übereinstimmend mit den Befunden von Tetsch und Wolff<sup>3)</sup>, daß aus vorgereinigtem oder rohem Gift stets das Gesamtgift als Pikrat niedergeschlagen wird. Aus dem Pikratniederschlag kann mit Wasser nur schwer etwas herausgelöst werden. Hieraus folgern wir, daß die beiden Komponenten eine salzartige Verbindung miteinander bilden, die von wäßriger Pikrinsäure nicht zerlegt wird, sondern als Ganzes ein Pikrat bildet. Mit dieser Auffassung lassen sich alle bisherigen Beobachtungen gut in Einklang bringen und unsere Kenntnisse über das Bienengift folgendermaßen zusammenfassen:

1) Das Bienengift stellt eine salzartige Verbindung aus zwei Komponenten dar. Komponente I ist eine, besonders in freiem Zustande, unbeständige, schwache Säure mit anscheinend hohem Phosphorgehalt. Sie ist der Träger der krampferregenden Wirkung des Bienengiftes.

Komponente II ist dagegen eine wesentlich höher molekulare, aber auch noch dialysable schwache Base, die in Wasser unlöslich und in trockenem Zustande offenbar unbeschränkt lange haltbar ist. Im Gegensatz zur Komponente I gibt sie Eiweißreaktion.

2) Durch die Vereinigung der beiden Komponenten zum Salz erhöht sich die Beständigkeit der Komponente I beträchtlich. In Wasser erleidet das Salz Hydrolyse im Sinne des Schemas:



<sup>2)</sup> Carlet, Compt. rend. Acad. Sciences **98**, 1550 [1884].

<sup>3)</sup> Tetsch u. Wolff, Biochem. Ztschr. **288**, 126 [1936].

Durch Wasserstoffionen wird die Hydrolyse zu Gunsten der Bildung nativen Giftes zurückgedrängt. Wäßrige Pikrinsäure fällt daher das Gesamtgift. Alkali zerlegt dagegen entsprechend der vorhandenen Hydroxylionen-Konzentration mehr oder weniger vollständig im Sinne der Bildung der beiden Komponenten. Mit Ammoniak tritt diese Spaltung beispielsweise nur dann quantitativ ein, wenn man konz. Giftlösungen bei 0° mit Ammoniakgas sättigt.

In Wasser ist das Salz nur unter teilweiser Hydrolyse löslich. Um das allmählich eintretende Ausfallen der Komponente II zu verhindern, bedarf es eines geringen Säurezusatzes. Die im Gifttröpfchen der Biene enthaltene, geringe Menge Ameisensäure hat wahrscheinlich — neben der Konservierung — diese Bedeutung.

Auf die Hydrolyse des nativen Giftes ist auch die Trennung der beiden Komponenten durch Dialyse zurückzuführen. Die Trennungsgeschwindigkeit erwies sich in Übereinstimmung damit stark abhängig vom  $p_{\text{H}}$ . Entsprechend dem oben gegebenen Schema liegt in saurem Medium das Salz vor, das wegen der Größe des Kations (Komponente II) nur sehr langsam dialysiert. Je schwächer sauer die Lösung ist, je mehr freie, schnell dialysierende Komponente I ist vorhanden. Tatsächlich dauert die Abtrennung der Komponente I bei  $p_{\text{H}}$  4 fast 3-mal so lange als bei  $p_{\text{H}}$  6.

Da uns nun eine bequeme Abtrennungsmethode der Komponente I zur Verfügung stand, haben wir versucht, diese schwach saure Substanz mit Hilfe geeigneter Salze rein darzustellen, was uns aber bisher nicht gelungen ist. Von allen untersuchten Salzen schien das Brucinsalz am aussichtsreichsten. Wäßrige Lösungen der rohen Komponente I lösen Brucin kalt auf und scheiden beim Eindunsten schöne, farblose Krystalle von Brucinsalzen aus, die aber nicht die Wirkungskomponente enthalten. Sie sind spielend wasserlöslich und müssen die Brucinsalze von Begleitsäuren sein. In — wegen der kleinen Mengen — recht mühsamen Umkrystallisationen wurden schließlich drei verschiedene Salze isoliert, von denen zwei (Schmp. 162° und Schmp. 272—273°) rein dargestellt und zur Analyse gebracht werden konnten.

Das dritte zeigte, aus absol. Alkohol und Äther umgefällt, stets zwischen 70—120° schwankende Schmelzpunkte, was — wie wir schließlich fanden — auf Hydrolyse durch geringe, nicht zu vermeidende Wasserspuren zurückzuführen war. Als wir daher aus 96-proz. Alkohol und Äther umfällten, blieb alles Brucin in Lösung und der ausfallende Teil bestand aus einer stickstoffhaltigen Substanz, deren stark erhöhter Schmelzpunkt sich indessen auch jetzt nicht konstant erhalten ließ, sondern zwischen 160—198° schwankte. Der Stoff rötet Lackmus, ist optisch inaktiv, gibt mit Jodjodkalium-Lösung eine für Alkaloide charakteristische Fällung und entfärbt Kaliumpermanganat- und Bromlösung. Soweit eine Fraktionierung bei der kleinen Menge möglich war, wurden derbe Krystalle mit gut ausgebildeten Flächen von langen, dünnen Nadeln abgetrennt. Diese Nadeln zeigten einen Zers.-Pkt. 178—180° und ergaben Werte, die etwa der Formel  $C_{11}H_{13}O_4N$  entsprachen. Aus der unfraktionierten Substanz konnte ein orangefarbenes, in Drusen krystallisiertes Pikrat vom Zers.-Pkt 270° erhalten werden, ferner ein Chlorhydrat vom Schmp. 180°, das aus alkohol. Salzsäure mit Äther gefällt, aus Methanol in dünnen Spießen krystallisiert. Brom in Eisessig liefert schließlich ein in dünnen Nadeln krystallisierendes farbloses Bromprodukt, das sich

oberhalb 210° zersetzt. Die Analysenwerte dieser Derivate haben sich aber leider nicht zu dem Ausgangsmaterial in Beziehung bringen lassen. Die Entwirrung des vorliegenden Gemisches muß nach Ansammlung größerer Mengen Substanz erneut versucht werden.

Außer diesen drei als Brucinsalze gefaßten Begleitsubstanzen wurden noch drei gut krystallisierte Pikrate gewonnen. Pikrat I mit dem Zers.-Pkt. 187° Pikrat II vom Zers.-Pkt 272—273° und Pikrat III mit dem Zers.-Pkt. 277—278°, auf deren Zerlegung wegen zu geringer Menge Substanz vorläufig verzichtet werden mußte.

Der Fa. H. Mack Nachf., Ulm a. d. D. und der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für Unterstützung der Arbeit dankbar.

### Beschreibung der Versuche.

#### 1) Gewinnung des Ausgangsmaterials.

Aus dem Rohmaterial von 20000 Winter-Bienen, das uns von der Fa. H. Mack Nachf., Ulm a. D., zur Verfügung gestellt wurde und aus Stacheln, Giftblasen und z. Tl. ausgetretenem Gift bestand, wurde durch Extraktion mit kalter  $\frac{1}{2}$ -n. Ameisensäure 4.5231 g Rohgift erhalten. Das bis zur Gewichtskonstanz über  $P_2O_5$  getrocknete Gift wurde nach Hahn und Ostermayer (l. c.) mit Alkohol steigenden Wassergehalts fraktioniert extrahiert. Es wurden schließlich folgende Fraktionen erhalten:

100-proz. Alkohol.....	0.9050 g	ungiftig
60-proz. Alkohol.....	1.9756 g	giftig
Rückstand.....	1.6425 g	ungiftig

#### 2) Zerlegung des Bienengiftes in zwei Komponenten mit Ammoniak.

196 mg des erhaltenen Extraktes mit 60-proz. Alkohol wurden in 4 ccm Wasser unter Zusatz einiger Tropfen  $\frac{1}{2}$ -n. Ameisensäure kalt gelöst. In diese im Zentrifugierrohr befindliche Lösung wurde unter Eiskühlung Ammoniakgas bis zur Sättigung eingeleitet. Die Ausfällung der Komponente II ist dann beendet. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, die Lösung durch ein Filter gegossen und der Niederschlag 2-mal mit konz. Ammoniak nachgewaschen, schließlich mit Aceton, dann mit Äther getrocknet. Erhalten: 67 mg Komponente II. Die ammoniakalische Lösung einschließlich der Washwässer wurde im Hochvakuum bei Zimmertemperatur höchstens aber 35—40° zur Trockne gebracht. Erhalten 123 mg Komponente I.

Tierversuche mit Komponente I: Konz.: 10 mg/ccm

Dosis: 0.5 mg/g Maus subc. inj. töteten durchschnittlich in 1—1½ Stdn. unter heftigen Krämpfen.

Tierversuche mit Komponente II: Konz.: 10 mg/ccm

Dosis: 0.42 mg/g Maus subc. inj. töteten durchschnittlich in 30 Stdn. ohne die geringste Krampferscheinung.

Konz.: 20 mg/ccm

Dosis: 0.8 mg/g Maus subc. inj. töteten in durchschnittlich 4—5 Stdn. ohne Auftreten von Krämpfen.

### 3) Untersuchung der durch fraktionierte Dialyse erhaltenen Komponenten auf Einheitlichkeit.

Es wurden die Dialysate benutzt, die Hahn und Leditschke in der IV. Mitteil. durch fraktionierte Dialyse von vorgereinigtem Bienengift gegen je 100 ccm Wasser gewonnen hatten. Die Dialysate 1—23 wirkten im Tierversuch krampferregend, während die Tiere von den Fraktionen 24—34 ohne Krämpfe getötet wurden.

107 mg aus Dialysat 7 und 8 wurden in der geschilderten Weise mit Ammoniak zerlegt. Erhalten: 58 mg Fällung = Komponente II und 42 mg Eindampfrückstand der ammoniakalischen Lösung = Komponente I.

149 mg Dialysat 9 und 10 ergaben: 82 mg Komponente II und 58 mg Komponente I. 152 mg Dialysat 25—30 ergaben: 105 mg Komponente II und 38 mg Komponente I.

Wenn also der Gehalt an Komponente I auf 26% gesunken ist, wie das im Dialysat 25—30 der Fall war, dann werden die Tiere bereits von der Komponente II getötet, bevor die Krämpfe ausgelöst werden. Es findet jedenfalls durch Dialyse nur eine Anreicherung aber keine völlige Trennung der Komponenten statt.

### 4) Prüfung der Ammoniakfällung auf Vollständigkeit.

33.7 mg des Fällungsproduktes (Komponente II) aus Extrakt mit 60-proz. Alkohol wurden in 2 ccm Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen  $\frac{1}{2}$ -n. Ameisensäure gelöst und wieder in der geschilderten Weise mit Ammoniak ausgefällt. Erhalten 32.5 mg. Die Fällung ist also praktisch quantitativ reproduzierbar. Die physiologische Wirkung der Komponente II bleibt unverändert.

### 5) Versuch der Zerlegung des Bienengiftes in seine zwei Komponenten mit Pikrinsäure.

Da Lösungen von Komponente I mit Pikrinsäure keine Fällung ergaben, wurden 450 mg Extrakt mit 60-proz. Alkohol in schwach ameisen-saurem Wasser gelöst und mit wäßriger Pikrinsäure-Lösung versetzt, bis sich kein Niederschlag mehr bildete. Das Pikrat, das teils amorph, teils ölig ausfiel, wurde abzentrifugiert und mehrfach mit Wasser nachgewaschen. Die vom Pikratniederschlag befreite Lösung einschließlich der Waschwässer wurde mit fein gepulvertem, reinem Acridin so lange geschüttelt, bis keine Pikrinsäure mehr in Lösung war. Dann wurde das überschüssige Acridin ausgeäthert und die Lösung im Hochvakuumverdampfer zur Trockne gebracht. Erhalten 287 mg Pikrat und 211 mg Trockenrückstand. Der Trockenrückstand zeigte im Tierversuch keine Giftwirkung. Dagegen rief das aus dem Pikratniederschlag zurückgewonnene Gift die Wirkung des nativen Bienengiftes hervor.

Daß die Komponente I bei dieser Operation ihre Wirkung nicht einbüßt, bzw. durch Adsorption oder andere Ursachen aus der Lösung entfernt wird, geht aus folgendem Versuch hervor: 157.9 mg durch Ammoniaktrennung von vorgereinigtem Bienengift erhaltene Komponente I wurden in 2 ccm Wasser gelöst und mit wäßriger Pikrinsäure-Lösung versetzt. Die geringe

Menge ausgefallenen Pikrates (24 mg) wurde abzentrifugiert, die Lösung durch ein Filter gegossen und mit Acridin von der überschüssigen Pikrinsäure befreit, und schließlich das überschüssige Acridin nach Zusatz von Ammoniak durch Ausäthern entfernt. Danach wurde die Lösung im Hochvakuum zur Trockne gebracht (145 mg) und im Tierversuch geprüft.

Tierversuch: Drei Mäuse; Konz.: 10 mg/ccm. Dosis: 0.5 mg/g Maus tötete die Tiere in durchschnittlich 3 Stdn. unter sehr starken Krämpfen. Eine Wirkungsver schlechterung gegen das Ausgangsmaterial war nicht festzustellen. Da Ammoniumsalze in höheren Dosen ebenfalls starke Krämpfe auslösen, wurde die Wirksamkeit von Ammoniumformiat, dem einzigen zugeführten Fremdsalz, nachgeprüft. In einer Dosis von 0.2 mg, 0.5 mg und 0.7 mg pro g Maus aber wurde dieses Salz bei subcutaner Injektion ohne äußere Erscheinungen vertragen. Ammoniumsalzwirkungen sind somit ausgeschlossen.

#### 6) Brucinsalze der Begleitsubstanzen des Bienengiftes.

a) Aus roher Komponente I: 660 mg rohe Komponente I, gewonnen durch Ammoniaktrennung vorgereinigten Bienengiftes, wurden in Wasser gelöst, mit überschüssigem, reinem Brucin versetzt und mehrere Stunden stehen gelassen. Danach wurde das ungelöst gebliebene Brucin abzentrifugiert und die Lösung bei gewöhnlicher Temperatur über  $P_2O_5$  zur Krystallisation stehen gelassen. Erstes Krystallisat: 57.4 mg, nach weiterem Einengen: 88.8 mg und schließlich aus der zur Trockne gebrachten Mutterlauge durch Extraktion mit Aceton noch weitere 64.2 mg Salz. Insgesamt somit 210.4 mg Rohsalz.

Unter dem Mikroskop ließen sich deutlich mindestens zwei verschiedene Individuen erkennen, von denen das eine in Wasser schwerer löslich war als das andere. 153 mg des Salzgemisches wurden daher mit wenig Wasser stehen gelassen, bis nur noch die schwerer lösliche Form zu erkennen war. Abgesaugt: 14.8 mg. Aus Wasser umgelöst, konnten schließlich nur 1.2 mg eines schöne, farblose fächerartige Krystalle bildenden Brucinsalzes gewonnen werden, das bei  $162^\circ$  schmolz. Weiter erhitzt, schäumte es bei  $169^\circ$  auf, um sich bei  $174^\circ$  unter Braunfärbung zu zersetzen. Es ist in Wasser und Alkohol gut löslich. Seine wäßrige Lösung gibt mit Ammoniak eine dicke Brucinfällung. Der restliche Teil des Salzgemisches schmolz unscharf zwischen  $100^\circ$  und  $120^\circ$ .

b) Zerlegung der Brucinsalze: 20 mg des Brucinsalzgemisches wurden unter Zusatz von etwa  $\frac{1}{2}$ -n. Ameisensäure in 2 ccm Wasser gelöst und unter Eiskühlung Ammoniak eingeleitet. Nach 1-stdg. Stehenlassen wurde das ausgeschiedene Brucin abgesaugt und mit wenig konz. Ammoniak nachgewaschen. Erhalten 11 mg Brucin. Die ammoniakalische Lösung wurde im Hochvakuumverdampfer bei  $30^\circ$  zur Trockne gebracht und zur Entfernung u. U. noch vorhandenen Ammoniumformiats 2-mal mit wenig Wasser abgedampft. Rückstand 8 mg. Er erwies sich im Tierversuch bei einer Dosis von 0.09 mg/g Maus als völlig unwirksam. Diese Dosis liegt zwar unter der tödlichen, hätte aber doch Krämpfe hervorrufen müssen. Demgegenüber zeigte die Mutterlauge der unter a) abgeschiedenen Brucinsalze noch deutlich die Wirkung der Komponente I in gleicher Dosis, womit bewiesen ist, daß die Komponente I nicht als Brucinsalz gebunden wird.

c) Gewinnung der Brucinsalze in der Wärme: Da die Möglichkeit bestand, daß das Ammoniumsalz der Komponente I von Brucin in der Kälte vielleicht nicht zerlegt werden würde, wurden 2.643 g rohe Komponente I in Wasser gelöst und mit überschüssigem Brucin im Wasserbad erhitzt, filtriert und die Lösung eingengt. An Krystallisation und Extrakt mit Aceton ließen sich insgesamt 4.010 g mit Brucin vermisches Rohsalz gewinnen.

Diese 4.01 g Rohsalz wurden mit Aceton heiß ausgezogen. Rückstand: 522 mg. Aus der Lösung beim Einengen: 1. Frakt. Brucin neben Brucinsalz. 2. Frakt. (durch Fällen mit Petroläther) braunes aber klares Harz neben wenig Brucinsalzen; 3. Frakt. (durch weiteren Zusatz von Petroläther) 355 mg farbloses Brucinsalz. Die Mutterlauge enthielt nun nur noch Brucin (916 mg). Wie sich nach der Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ergab, wird in der Wärme nicht mehr Salz erhalten als in der Kälte.

Reinigung der Fraktion 1: Das in Aceton offensichtlich schwerer lösliche Brucinsalz der ersten Fraktion wurde durch wiederholtes Umkrystallisieren aus Aceton vom beigemischten Brucin befreit. Es wurden 210 mg eines Salzes erhalten, dessen Zers.-Pkt. 272—273° nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Methanol-Äther konstant blieb. Farblose derbe Spieße, die in Aceton schwer, in Wasser leicht löslich sind.

3.895 mg Sbst. (100°, 15 mm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 8.47 mg CO<sub>2</sub>, 2.45 mg H<sub>2</sub>O. — 2.858 mg Sbst.: 0.156 ccm N<sub>2</sub> (25°, 756 mm).

Gef. C 59.31, H 7.04, N 6.22.

100 mg Salz wurden in 2 ccm Wasser gelöst und mit einigen Tropfen konz. Ammoniaks versetzt. Nach 1/2-stdg. Stehenlassen in der Kälte wurde vom Brucin abgesaugt, mit konz. Ammoniak nachgewaschen und das Brucin konstant getrocknet. Erhalten 80.9 mg Brucin. Die Lösung wurde zur Trockne gebracht. 14.4 mg Rückstand, der teils krystallin, teils ölig ist. Er rötet Lackmus und löst sich leicht in Methanol. Beim Versetzen der methylalkohol. Lösung mit Aceton entstand eine amorphe Fällung, die beim Versetzen mit Wasser wieder krystallisierte. Die Krystalle schmelzen nicht, sondern sublimieren bei 200°. Die ölige, klebrige Masse konnte der geringen Menge wegen noch nicht weiter untersucht werden.

Reinigung der Fraktion 2: Die Brucinsalze der zweiten Fraktion konnten durch mehrfaches Umkrystallisieren aus Aceton-Petroläther von den harzigen Verunreinigungen abgetrennt und mit den Salzen der dritten Fraktion vereinigt werden.

Reinigung der Fraktion 3: Die dritte Fraktion, ein farbloses Salzgemisch, wurde aus Aceton-Petroläther zu fraktionieren versucht, indessen schwankten die Schmelzpunkte trotz vieler Wiederholungen stets zwischen 80° und 120°. Es traten dabei drei verschiedene Krystallformen auf, die aber gleiche Auslöschungsschiefe besaßen und daher wohl als identisch angesehen werden müssen. Die Analyse einer Fraktion vom höchsten Schmelzpunkt 120° ergab folgende Werte:

3.940 mg Sbst. (60°, 15 mm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 8.98 mg CO<sub>2</sub>, 2.57 mg H<sub>2</sub>O. — 2.470 mg Sbst.: 0.134 ccm N<sub>2</sub> (20°, 759 mm).

Gef. C 62.16, H 7.30, N 6.31.



Da die Mutterlaugen der Umkrystallisationen stets freies Brucin enthielten, mußte angenommen werden, daß das Salz sehr leicht Hydrolyse erleide. Diese wurde deshalb absichtlich gefördert durch Verwendung 96-proz. Alkohols als Lösungsmittel, aus dem mit Äther gefällt wurde. Hierbei trat in der Tat eine Erhöhung des Schmelzpunktes ein. Nach der zwölften Umkrystallisation hatten sich alle Brucinsalze vom unscharfen Schmp. 80—120° in eine Substanz vom Schmp. 190—195° umgewandelt, aus deren Lösungen Natronlauge kein Brucin mehr ausfällt. Aus den Mutterlaugen konnte daraufhin der Rest der Substanz noch einfacher dadurch gewonnen werden, daß diese mit ammonikalischem Methanol gespalten und die Substanz dann mit Äther zur Abscheidung gebracht wurde.

Sie wurde mehrfach aus Methanol-Äther, Aceton-Äther und Chloroform-Äther umgefällt, ohne daß es gelungen wäre, den Schmelzpunkt konstant zu erhalten. Er schwankte nunmehr zwischen 160° bis 198°. Eine Fraktion derber, farbloser Krystalle vom höchsten Schmelzpunkt ergab folgende Werte:

3.925 mg Sbst. (70°, 15 mm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 8.58 mg CO<sub>2</sub>, 2.27 mg H<sub>2</sub>O. — 3.246 mg Sbst.: 0.170 ccm N<sub>2</sub> (22°, 753 mm).

C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>N (223). Ber. C 59.19, H 5.87, N 6.27.

Gef. „ 59.62, „ 6.47, „ 6.00.

Eine Fraktion aus Nadeln vom Schmp. 168—180° ergab sehr ähnliche Werte:

3.128 mg Sbst. (70°, 15 mm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 6.770 mg CO<sub>2</sub>, 1.890 mg H<sub>2</sub>O. — 2.898 mg Sbst.: 0.144 ccm N<sub>2</sub> (22.5°, 762 mm).

C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>N (225). Ber. C 58.67, H 6.71, N 6.22.

Gef. „ 59.03, „ 6.76, „ 5.75.

Pikrat: 31 mg der Substanz Schmp. 190° wurden in wenig Methanol gelöst und mit methylalkohol. Pikrinsäure-Lösung versetzt. Das Pikrat fiel zuerst amorph, wurde aber nach kurzem Stehenlassen krystallin. Ausb. 35 mg. Nach dem Umkrystallisieren aus Eisessig-Äther wurden kleine orange-farbene Drusen erhalten, die bei 270° unt. Zers. schmolzen.

4.993 mg Sbst. (80°, 15 mm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 9.965 mg CO<sub>2</sub>, 3.110 mg H<sub>2</sub>O (0.01 mg Rest). — 2.801 mg Sbst.: 0.257 ccm N<sub>2</sub> (23.5°, 759 mm).

C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>N, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>. Ber. C 45.12, H 3.57, N 12.39.

(C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>N)<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>. Ber. „ 49.76, „ 4.33, „ 10.37.

Gef. „ 54.54, „ 6.98, „ 10.55.

Hieraus folgt, daß die Ausgangssubstanz entsprechend ihrem unscharfen Schmelzpunkt nicht einheitlich ist.

Chlorhydrat: 52 mg der Substanz vom Schmp. 190° wurden mit Methanol und Chlorwasserstoff 2 Stdn. erhitzt. Nach dem Einengen der Lösung wurden mit Äther Krystalle gefällt, die, aus Methanol-Äther umgefällt, sich langsam oberhalb 180° ohne zu schmelzen zersetzen. Die Substanz enthielt Chlor, war aber noch löslich in Natronlauge, woraus wir schließen, daß keine Veresterung eingetreten war.

4.792 mg Sbst. (60°, 15 mm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 10.430 mg CO<sub>2</sub>, 2.720 mg H<sub>2</sub>O. — 2.972 mg Sbst.: 0.145 ccm N<sub>2</sub> (22°, 759 mm).

Gef. C 59.36, H 6.35, N 5.63.

Einwirkung von Brom: 58 mg Substanz vom Schmp. 190° wurden in wenig Wasser gelöst und tropfenweise mit Brom in Eisessig versetzt, bis keine Fällung mehr eintrat. Die ausgefallene Bromverbindung war zunächst amorph, wandelte sich aber schnell in kleine, gelbe, zu Drusen vereinigte Nadeln um. Ausb. 47 mg. Die Substanz wurde aus Methanol-Äther umgefällt und bildete dann farblose dünne Nadeln, die sich oberhalb 210° ohne zu schmelzen zersetzten und Brom in nichtionogener Bindung enthielten.

4.792 mg Sbst. (50°, 15 mm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 10.525 mg CO<sub>2</sub>, 2.470 mg H<sub>2</sub>O. — 2.8430 mg Sbst.: 0.131 ccm N<sub>2</sub> (23.5°, 754 mm).

Gef. C 54.28, H 5.77, N 5.28.

Pikrat aus dem Harzanteil der Fraktion 2: 0.69 g des harzartigen Anteils aus den Mutterlaugen der Brucinsalzfraktionierung (Frakt. 2) wurden in wenig Wasser gelöst und mit überschüssiger Pikrinsäure-Lösung versetzt. Die gelbe amorphe Fällung wurde abgesaugt und die Mutterlauge etwas eingengt, nachdem sich Krystalle eines offenbar leichter löslichen Pikrats nach einigem Stehenlassen abgeschieden hatten. Insgesamt wurden 36 mg krystallisiertes Pikrat erhalten. Nach 3-maligem Umfällen der grünlichgelben Drusen aus Aceton-Äther lag der Zers.-Pkt. bei 277—278°.

d) Gewinnung der Brucinsalze aus rohem Bienengift: Da die Möglichkeit bestand, daß bei der Vorreinigung des Bienengiftes mit Alkohol steigenden Wassergehaltes die gefaßten Nebenprodukte zum Teil verloren gingen, wurde von rohem Bienengift ausgegangen. Seine wäßrige Lösung wurde in der unter a bzw. c geschilderten Weise mit Brucin versetzt und analog aufgearbeitet. Es wurden dieselben Salze — aber in etwas größerer Menge — erhalten. Ferner ließen sich aus den harzigen Bestandteilen zwei weitere Pikrate isolieren. Die Rohsalze wurden sofort mit ammoniakalischem Methanol zerlegt und mit Äther gefällt. Das vom Harz durchsetzte Krystallgemisch konnte mit wenig Methanol und Äther von diesem Harz getrennt werden. Aus der wäßrigen Lösung des Harzes fällte Pikrinsäure wieder einen amorphen Niederschlag, aus dessen Mutterlaugen nunmehr 78 mg eines in derben, orange gefärbten Drusen krystallisierenden Pikrats vom konstanten Zers.-Pkt. 187° (2-mal aus Methanol) erhalten wurden. Pikrat I:

3.940 mg Sbst. (80°, 15 mm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 6.78 mg CO<sub>2</sub>, 1.91 mg H<sub>2</sub>O. — 3.263 mg Sbst.: 0.426 ccm N<sub>2</sub> (25°, 756 mm).

C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub> (384.2). Ber. C 46.85, H 5.25, N 14.58.

Gef. „ 46.93, „ 5.42, „ 14.87.

C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub> — Pikrinsäure = C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>ON.

Pikrat II: Das amorphe Pikrat (66 mg) ließ sich aus Eisessig-Äther krystallin erhalten. Es wurde in kleinen orangen Drusen gewonnen, die sich bei 272—273° zersetzten. Krystallgehalt und Löslichkeiten unterscheiden es deutlich vom Pikrat III.