

267. Die Bufogenine des Paratoidensekretes von *Bufo marinus* (L.) SCHNEIDER

Über Krötengifte, 21. Mitteilung¹⁾

von M. Barbier, H. Schröter, K. Meyer, O. Schindler und T. Reichstein

(2. X. 59)

Aus dem Sekret der im nördlichen Teil von Südamerika und in Zentralamerika lebenden Kröte *Bufo marinus* haben ABEL & MACHT²⁾ das erste kristallisierte Bufogenin isoliert. Sie nannten es Bufagin. Denselben Stoff isolierten auch JENSEN & CHEN³⁾ sowie CHEN & CHEN⁴⁾, die zur Vermeidung von Verwechslungen den heute gültigen Namen Marinobufagin vorschlugen. Der Stoff ist von DEULOFEU & MENDIVE⁵⁾ sowohl aus *Bufo marinus* wie aus *B. paracnemis* LUTZ⁶⁾ erhalten worden, letztere ist aber vermutlich nur eine Varietät von *B. marinus*. Aus einem von DEULOFEU gewonnenen Rohkristallisat ist von MEYER⁷⁾ durch Chromatographie neben Marinobufagin etwa gleichviel Telocinobufagin isoliert worden. Kürzlich wurden von SCHRÖTER und Mitarb.⁸⁾ eine Reihe von Sekreten verschiedener Krötenarten papierchromatographisch verglichen. Das Sekret von *Bufo marinus* gab dabei Flecke, deren Laufstrecken den folgenden Geninen entsprachen: Marinobufagin, Telocinobufagin, Bufotalidin = Hellebrigenin, Gamabufotalin und Hellebrigenol. Die drei letztgenannten waren schwach.

Vorliegende Untersuchung hatte den Zweck, das obige Ergebnis durch präparative Trennung zu sichern und evtl. zu ergänzen. Es standen uns dafür die folgenden zwei Proben zur Verfügung:

Probe a) 105 g nicht völlig getrocknetes Sekret von salbenartiger Beschaffenheit, das von Herrn Prof. HASSAL⁹⁾ im Juni 1956 in Jamaica gewonnen, daselbst in Glasampullen eingeschmolzen uns zugeschiedt wurde;

Probe b) 75 g stark getrocknetes Sekret in Form harter elastischer Schuppen, das von Herrn Dr. FENG⁹⁾ im Sommer 1957 ebenfalls in Jamaica gesammelt wurde.

Für die Aufarbeitung der zwei Proben wurden etwas verschiedene Methoden benutzt. Die Analyse der Probe a) wurde besonders sorgfältig vorgenommen, um möglichst auch die in kleiner Menge vorhandenen Genine zu fassen. Bei der Trennung von Probe b) sollte möglichst viel Marinobufagin für chemische Arbeiten gewonnen

¹⁾ 20. Mitteilung: R. REES, O. SCHINDLER, V. DEULOFEU & T. REICHSTEIN, *Helv.* **42**, 2400 (1959).

²⁾ J. J. ABEL & D. I. MACHT, *J. Pharmacol. & exper. Therap.* **3**, 319 (1911–1912).

³⁾ H. JENSEN & K. K. CHEN, *J. biol. Chemistry* **100**, Proc. p. LVII (1933).

⁴⁾ K. K. CHEN & A. L. CHEN, *J. Pharmacol. & exper. Therap.* **49**, 514 (1933).

⁵⁾ V. DEULOFEU & J. R. MENDIVE, *Liebigs Ann. Chem.* **534**, 288 (1938).

⁶⁾ A. LUTZ, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **28**, 111 (1934).

⁷⁾ K. MEYER, *Helv.* **34**, 2147 (1951).

⁸⁾ H. SCHRÖTER, CH. TAMM, T. REICHSTEIN & V. DEULOFEU, *Helv.* **41**, 140 (1958).

⁹⁾ Wir danken Herrn Prof. C. H. HASSAL, damals am University College of the West Indies, Chemistry Department, in Mona-St. Andrew, Jamaica, sowie Herrn Dr. P. C. FENG, Lecturer in Pharmacology an demselben Ort, auch hier bestens für dieses Material.

werden. Die Hauptresultate waren bei beiden Proben ähnlich. Alle Trennungen wurden weitgehend durch papierchromatographische Kontrolle verfolgt.

Untersuchung von Probe a). – Zur Vortrennung diente hier eine grobe Verteilungschromatographie¹⁰⁾. Die 105 g Sekret lieferten dabei:

17,4 g Chloroform-Eluate, enthält u. a. Sterine und Genine;

0,242 g Chloroform-Butanol-Eluate¹¹⁾ (nicht untersucht, mit folgendem Me-Eluat vereinigt);

33,763 g Methanol-Eluat, enthält u. a. Hauptmenge der Toxine und Basen.

Bisher wurden nur die Chloroform-Eluate untersucht, da sie praktisch alle hier interessierenden Bufogenine enthielten. Durch Papierchromatographie in sechs Systemen (Fig. 1, 2, 4, 5, 6 und 7) liessen sich darin, teilweise erst nach präparativer Anreicherung, insgesamt 11 Bufogenine nachweisen. Sie wurden zunächst in der Reihenfolge zunehmender Polarität geordnet und mit den Buchstaben R, L, M1, M2, T, N, A, B1, B2, C und D bezeichnet. Für den Nachweis diente dabei die direkte Photokopie im gefilterten UV.-Licht¹²⁾ sowie anschliessendes Spritzen mit SbCl₃-Lösung¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾. Die beim Erhitzen mit SbCl₃ auftretenden Färbungen (Tab. 1) erlauben teilweise eine zusätzliche Differenzierung. Durch die im folgenden beschriebenen Trennungen liessen sich 7 der genannten Stoffe (R, M1, M2, T, A, B1 und B2) in Kristallen gewinnen (vgl. Tab. 2); ein achter (C) konnte als krist. O-Acetyl-Derivat gefasst werden; die drei weiteren (L, N und D) wurden in Form amorpher aber papierchromatographisch einheitlicher Konzentrate erhalten. Von den 8 krist. Stoffen konnten 7 (R, M1, M2, T, A, B2 und O-Acetyl-C) mit bekannten Geninen identifiziert werden (vgl. Tab. 2). Der letzte, B1, ist vermutlich ein neuer Stoff. Er wurde als Jamaicaobufagin bezeichnet, aber nur in sehr kleiner Menge erhalten, die keine genaue Untersuchung erlaubte. Die nur in Spuren und in amorpher Form isolierte Subst. N dürfte nach ihren Eigenschaften mit dem kürzlich beschriebenen¹⁶⁾ Argentinogenin identisch sein. Die ebenfalls nur in Spuren und in amorpher Form erhaltenen Substanzen L und D konnten mit keinem bekannten Genin identifiziert werden; insbesondere waren im Sekret von *Bufo arenarum*¹⁶⁾ keine Stoffe anwesend, die im Papierchromatogramm gleiche Laufstrecken zeigten.

Fig. 1–8 sind schematisierte aber massgetreue Beispiele von Papierchromatogrammen. Fig. 1–7 zeigt das Verhalten der freien Genine und Fig. 8 dasjenige der O-Acetyl-Derivate. Ausführung wie früher beschrieben¹⁷⁾. Bedeutung der Buchstabenbezeichnungen vgl. Tab. 1 und 2. Bei der Bezeichnung der Systeme¹⁸⁾ ist das vor dem schrägen Strich stehende Lösungsmittel oder Gemisch die bewegliche, das nach dem schrägen Strich stehende die ruhende Phase. Wo keine Front (gestrichelt) eingezeichnet ist, wurde sie abtropfen gelassen. Bei krist. Einzelstoffen wurden jeweils ca. 0,08 mg, bei Gemischen oder rohen Fraktionen 0,15 mg oder mehr aufgetragen.

¹⁰⁾ H. R. URSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 883 (1955).

¹¹⁾ Es wurde hier nur mit je 1,8 l Chf-Bu-(9:1) und Chf-Bu-(8:2) sowie mit 3 l Chf-Bu-(1:1) eluiert, daher waren die Toxine noch grösstenteils auf der Säule und wurden erst mit Me eluiert.

¹²⁾ R. BERNASCONI, H. P. SIGG & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 1767 (1955).

¹³⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* **34**, 2278 (1951).

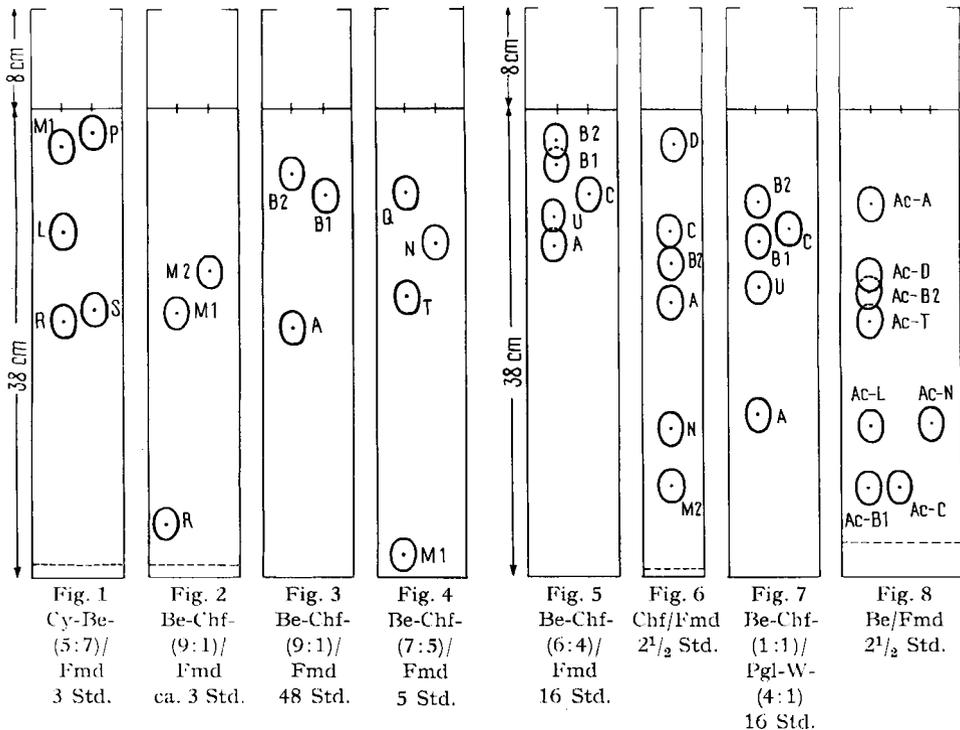
¹⁴⁾ D. LAWDAY, *Nature* **170**, 415 (1952).

¹⁵⁾ J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1270 (1957); R. BOLLIGER & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1659 (1957).

¹⁶⁾ R. REES, O. SCHINDLER, V. DEULOFEU & T. REICHSTEIN, *Helv.* **42**, 2400 (1959).

¹⁷⁾ A. ZAFFARONI, R. B. BURTON & E. H. KEUTMANN, *Science* **111**, 6 (1950); R. B. BURTON, A. ZAFFARONI & E. H. KEUTMANN, *J. biol. Chemistry* **188**, 763 (1951); O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 108 (1951).

¹⁸⁾ Abkürzungen für Lösungsmittel usw. vgl. Einleitung zum Exper. Teil.

Tabelle 1. Färbungen der Flecke mit $SbCl_3$ ^{13) 14) 15)} auf mit Formamid imprägniertem Papier¹⁹⁾

Stoff	Färbung mit $SbCl_3$ erhitzt, Tageslicht	
	freies Genin	O-Acetylderivat
R = Resibufogenin	violett	blau-violett
S = Cinobufagin ²⁰⁾	gelbgrün	
L = Subst. L (amorph)	intensiv violett	graugelb
M1 = Bufalin	blaugrau	graublau
M2 = Marinobufagin	braungrün	graubraun
P = Cinobufotalin ²⁰⁾	violett	
T = Telocinobufagin	blau	violett
N = Argentinogenin	fast farblos	rosa
Q = Arenobufagin ²⁰⁾	farblos	
A = Hellebrigenin = Bufotalidin	gelb	gelb
U = Unbekannter Fleck (Probe b)	violett	
B1 = Jamaicobufagin	kalt: gelb, nach Erhitzen: grün	graublau, rosa (nach 10')
B2 = Hellebrigenol	graugelb	gelb
C = Gamabufotalin	lilablau	graublau
D = Subst. D (amorph)	braun	ocker

¹⁹⁾ Das Papier wurde nach der Chromatographie durch Erhitzen auf 90° während ca. 30 Min. von Fmd befreit.

²⁰⁾ Diente nur zum Vergleich, wurde aus dem Sekret von *Bufo marinus* nicht isoliert.

Tabelle 2. Die elf aus dem Sekret von *Bufo marinus* (Probe a) isolierten Bufogenine

Buchstabenbezeichnung	Identifizierung bzw. neuer Name	Smp.		[α] _D	
		nach Lit.	hier gefunden	nach Lit.	hier gefunden
R	Resibufogenin	85–169° ²¹⁾	120–130°/ 200–218°	– 5,4 Chf ²¹⁾	nicht best.
	O-Acetyl- „	218–230° ²²⁾	223–234°	– 1,1 Chf ²²⁾	– 1,8 Chf
L	Subst. L	neu	amorph	—	nicht best.
M1	Bufalin	244–248° ²³⁾	230/242–248°	– 8,7 Chf ²³⁾	– 6,7 Chf
	O-Acetyl- „	230–248° ²³⁾	236–247°	– 6,0 Chf ²³⁾	– 6,0 Chf
M2	Marinobufagin	224–225° ²⁴⁾	215–220°	+ 10,0 Chf ²⁴⁾	+ 10,2 Chf
	O-Acetyl- „	194–220° ²⁴⁾	200–220°	+ 25,7 Chf ²⁴⁾	+ 24,9 Chf
T Ac-T	Telocinobufagin	210–211° ²³⁾	201–208°	+ 4,4 Chf ²³⁾	+ 5,5 Chf
	O-Acetyl- „	275–280° ²³⁾	266–272°	+ 22,9 Chf ²³⁾	+ 20,4 Chf
N Ac-N	Argentinogenin	227–230° ¹⁶⁾	amorph	– 20,6 Chf ¹⁶⁾	nicht best.
	O-Acetyl- „	amorph ¹⁶⁾	„	—	„ „
A Ac-A	Hellebrigenin – Bufotalidin	150/237° ²⁵⁾	150–155°	+ 18,0 An ²⁵⁾	„ „
	O-Acetyl- „	242–247° ²⁵⁾	–	+ 33,7 Chf ²⁵⁾	„ „
B1 Ac-B1	Jamaicobufagin	neu	164–173°	—	„ „
	O-Acetyl- „	„	162–178°	—	+ 52,7 Chf
B2 Ac-B2	Hellebrigenol	146–155° ²⁶⁾	145 154°	+ 5,3 Me ²⁶⁾	nicht best.
	Di-O-acetyl- hellebrigenol.	126° ²⁵⁾ ²⁶⁾	nicht krist.	+ 36,3 Chf ²⁵⁾	„ „
C Ac-C	Gamabufotalin.	261–263° ²⁷⁾	nicht krist.	+ 1,3 Me ¹⁵⁾	„ „
	Di-O-acetyl- „	265–266° ²³⁾	215–237° ²⁸⁾	– 11,4 Chf ¹⁵⁾	„ „
D Ac-D	Subst. D	neu	amorph	—	„ „
	O-Acetyl-Subst. D	„	„	—	„ „

Ausführung der Trennung. Das Material (17,3 g) wurde zunächst in 2 Portionen an Al₂O₃ chromatographiert und diese Operation mit einigen Mischfraktionen wiederholt, worauf sich etwas Sterine (nicht untersucht) sowie die Hauptmenge Marinobufagin (M2) und etwas Telocinobufagin (T) in reiner Form abtrennen liessen. Die verbleibenden Gemische wurden nach dem Ergebnis der papierchromatographischen Prüfung in fünf Gruppen zusammengefasst (vgl. Tab. 4).

Gruppe 1 wurde zunächst an Al₂O₃ chromatographiert, worauf sich noch etwas M1 und M2 rein abtrennen liessen. Die verbliebenen Gemische, in denen R und L angereichert waren, wurden einer Verteilungschromatographie unterworfen, wobei

²¹⁾ H. LINDE & K. MEYER, *Pharmac. Act. Helv.* **33**, 327 (1958).

²²⁾ K. MEYER, *Helv.* **35**, 2444 (1952).

²³⁾ K. MEYER, *Pharmac. Act. Helv.* **24**, 222 (1949).

²⁴⁾ K. MEYER, *Helv.* **34**, 2147 (1951); ST. PATAKI & K. MEYER, *Helv.* **38**, 1631 (1955).

²⁵⁾ J. SCHMUTZ, *Helv.* **32**, 1442 (1949).

²⁶⁾ A. KATZ, *Helv.* **40**, 831 (1957).

²⁷⁾ M. KOTAKE, *Liebigs Ann. Chem.* **465**, 11 (1928).

²⁸⁾ Nur 0,5 mg Kristalle erhalten, durch Papierchromatogramm identifiziert.

Tabelle 3. *Farbreaktionen der Subst. N und der drei neuen Stoffe B1, D und L mit H₂SO₄ nach angegebener Zeit*

Zeit	Jamaicobufagin B1		Subst. D	Subst. L	Subst. N = Argentino- genin
	freies Genin	O-Acetyl- Verbindung			
Mit 84-proz. H ₂ SO ₄					
0'	gelbgrün	hellgelb	blassgelb	gelb	gelb
15'	braungrün	hellgrün	ocker	"	ocker
1 Std.	"	schmutzig grün	" m. Braun- stich	"	"
2 Std.	dunkelgrün	mauve	dunkelbraun	"	schmutzig ocker
3-4 Std.	"	"	mauve	" bis 24 Std.	grau
Mit konz. H ₂ SO ₄					
0'	braungrün	gelb	gelbbraun	gelb	gelb
15'	olivgrün	braungrün	schmutzig ocker	"	gelbbraun
1 Std.	graugrün	braungrün	" "	"	"
2-4 Std.	graublau	blauviolett	braungrün	" bis 24 Std.	braun

Tabelle 4. *Unterteilung des Geningemisches in 5 Gruppen*

Gruppen Nr.	Gewicht in mg	Habitus	Flecke im Pchr	Weitere Verarbeitung	Daraus rein isoliert
1	752	amorph	R, L, M1, M2	Al ₂ O ₃ -Chrom. Verteilung Präp. Pchr	R, L, M1, M2
2	315	krist.	M2, T	Al ₂ O ₃ -Chrom	T
3	103	krist.	M, T, A, B1	Reagens T Al ₂ O ₃ -Chrom.	A, B1
4	160	amorph	M2, T, B1	Präp. Pchr	B1-Konzentrat
5	123	amorph	M2, T, A, B2, C, D	SiO ₂ -Chrom. Reagens T Präp. Pchr	M2, N ²⁰⁾ , T, A, B2, C, D

Propylenglykol-Wasser als ruhende sowie Benzol und Benzol-Chloroform-Gemische als bewegliche Phase dienten. Dabei liess sich aber nur M1 glatt abtrennen. Das verbliebene Gemisch von R und L wurde durch präparative Papierchromatographie getrennt.

Gruppe 2 war ein Kristallgemisch, das neben M2 vorwiegend T enthielt. Es liess sich an Al₂O₃ teilweise trennen.

Gruppe 3, ebenfalls ein Kristallgemisch, wurde zunächst (in 2 Portionen) mit Reagens T von GIRARD & SANDULESCO³⁰⁾ behandelt. In der früher beschriebenen Weise³¹⁾ liessen sich 9,5 mg Aldehyde und 60,3 mg aldehydfreie Anteile gewinnen. Aus ersteren konnte krist. Hellebrigenin (A) erhalten werden. Die aldehydfreien An-

²⁰⁾ Der N-Fleck wurde erst nach präparativer Anreicherung durch Chromatographie an SiO₂ sichtbar.

³⁰⁾ A. GIRARD & G. SANDULESCO, *Helv.* **19**, 1095 (1936).

³¹⁾ O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 521 (1951).

teile lieferten nach Chromatographie an Al_2O_3 eine kleine Menge krist. Jamaica-
bufagin (B1).

Gruppe 4. Dies Material wurde direkt durch präparative Papierchromatographie
getrennt, worauf sich noch 28,8 mg amorphes, aber papierchromatographisch ein-
heitliches Jamaica bufagin (B1) abtrennen liessen. Auf Isolierung von M2 und T aus
diesem Material wurde verzichtet.

Gruppe 5. Dieses Gemisch wurde zuerst an Silicagel chromatographiert, was die
Abtrennung von M2, N, T und D in reiner Form erlaubte. Das verbliebene Ge-
misch von A, B2, C und D (41 mg) wurde wie bei Gruppe 3 mit Reagens T behandelt.
Auf Versuche zur Isolierung der Aldehyde wurde hier verzichtet. Die aldehydfreien
Anteile (36 mg) zeigten im Papierchromatogramm nur noch die Flecke B2 und C³²⁾.
Sie wurden durch präparative Papierchromatographie getrennt. Dabei konnte eine
kleine Menge Hellebrigenol (B2) in Kristallen isoliert werden. Von dem Material,
das nur den C-Fleck zeigte (Gamabufotalin) wurden nur 4,6 mg erhalten, die nicht
kristallisierten. Nach Acetylierung wurde aber eine kleine Menge Kristalle gewonnen,
die nach Papierchromatogramm, Farbreaktionen und IR.-Spektrum mit Di-O-
acetyl-gamabufotalin identisch waren.

In Tab. 5 sind die Ausbeuten an den 11 genannten Geninen zusammengestellt.
Ausserdem wird eine Schätzung der wirklich vorhandenen Menge gegeben³³⁾.

Tabelle 5. Übersicht über die erhaltenen Ausbeuten und rohe Schätzung der im Sekret (Probe a)
wirklich vorhandenen Mengen³³⁾

Buchstabenbezeichnung und Name	Isoliert aus 105 g Trockensekret Menge		Schätzung der wirklich vorhandenen Menge	
	in mg	in %	in mg	in %
R Resibufogenin	43,5	0,04	70	0,07
L Subst. L	roh 10,9	0,01	20	0,02
M1 Bufalin	502	0,48	700	0,7
M2 Marinobufagin	8263	7,88	10000	10,0
T Telocinobufagin	67	0,06	800	0,8
N Argentinogenin	roh 6,6	0,006	10	0,01
A Hellebrigenin	4,8	0,005	60	0,06
B1 Jamaica bufagin	roh 30	0,03	70	0,07
B2 Hellebrigenol	krist. 2	0,002	20	0,02
C Gamabufotalin.	roh 5,5	0,005	20	0,02
D Subst. D	roh 8	0,008	30	0,03

Untersuchung von Probe b). – Dies Material (75 g) wurde nach TSCHESCHE
& OFFE³⁴⁾ mit Sand verrieben und im Soxhlet mit Chloroform, dann mit Chloroform-
Methanol je 8 Std. extrahiert. Diese Extrakte (16,5 g) zeigten im Papierchromato-
gramm ausser M2 und T drei langsame Flecke (A, U und B von Fig. 5 und 7). Sie
wurden in zwei Portionen an Al_2O_3 chromatographiert, worauf sich die Hauptmenge

³²⁾ D scheint sich demnach auch mit Reagens T umgesetzt zu haben.

³³⁾ Schätzung auf Grund der erhaltenen Ausbeute, der Kristallisierbarkeit, sowie der Stärke
der Flecke in den Papierchromatogrammen.

³⁴⁾ R. TSCHESCHE & H. A. OFFE, Ber. deutsch. chem. Ges. **68**, 1998 (1935).

Marinobufagin (M2) sowie ein Teil des Telocinobufagins (T) und Hellebrigenins (A) in Kristallen abtrennen liess³⁵). Die verbleibenden Gemische (ausser den leicht eluierbaren Teilen) wurden nochmals gleich chromatographiert und gaben noch etwas mehr derselben drei Stoffe. Von den nunmehr erhaltenen Gemischen wurde ein Teil (80 mg) der schwer eluierbaren Anteile (ca. 104 mg, enthaltend T, A, U und B1) durch präparative Papierchromatographie getrennt, wobei A und B1 in Kristallen isoliert werden konnten, während U in amorpher, aber papierchromatographisch reiner Form erhalten wurde³⁶). Ein weiterer Anteil (80 mg) der noch schwerer eluierbaren Anteile (100 mg, enthaltend vorwiegend A und B2) lieferte nach präparativer Papierchromatographie 16 mg rohes Hellebrigenol (B2), das zwar nicht kristallisierte, aus dem sich aber etwas krist. Di-O-acetyl-hellebrigenol isolieren liess.

Insgesamt wurden aus Probe b) die folgenden Mengen an reinen Kristallen erhalten:

11,0 g	entspr. 14,6 %	Marinobufagin (M2),
1,12 g	„ 1,48 %	Telocinobufagin (T),
36 mg	„ 0,048%	Hellebrigenin (A),
2 mg	„ 0,003%	Jamaicobufagin (B1),
2 mg	„ 0,003%	Di-O-acetyl-hellebrigenol (Ac-B2).

Ferner wurden ca. 12 mg amorphe, aber papierchromatographisch einheitliche Subst. U erhalten.

Beim Vergleich der Ausbeuten ist zu berücksichtigen, dass die Verarbeitung der Proben a) und b) verschieden erfolgte und dass das Ziel verschieden war. Die Übereinstimmung ist dann befriedigend.

Die Identifizierung der bekannten Genine erfolgte, soweit sie kristallisiert vorlagen, bei beiden Proben durch Smp., Mischprobe, Papierchromatogramm und Farbreaktionen. In einigen Fällen wurden auch die Drehungen bestimmt, die IR.-Spektren aufgenommen und die O-Acetyl-Derivate bereitet. Im folgenden wird die Identifizierung der Subst. N sowie die Charakterisierung der 4 neuen Genine (L, U, B1 und D) kurz besprochen.

*Identifizierung von Subst. N mit Argentinogenin*¹⁶). Von Subst. N wurden nur 5 mg amorphes Material erhalten, das auch nach Impfen mit Argentinogenin nicht kristallisierte. Das Präparat zeigte aber im Papierchromatogramm (System von Fig. 6) dieselbe Laufstrecke wie Argentinogenin. Auch die Färbungen mit SbCl_3 und H_2SO_4 waren genau gleich; ebenso die Laufstrecken der O-Acetyl-Derivate. Ausserdem gab N mit FeCl_3 in einer Spur Methanol verflüssigt, mit Wasser verdünnt, eine intensive grauviolette Färbung und zeigte im UV. (in Alkohol) ein Maximum bei $292 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,71$ (ber. auf $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$)³⁷) sowie im IR. (in CH_2Cl_2) eine mittelstarke

³⁵) Die leichter eluierbaren Anteile, welche die Sterine, das Resibufogenin und Subst. L enthalten sollten, wurden bei dieser Probe nicht untersucht.

³⁶) Der U-Fleck war im Papierchromatogramm des Totalextraktes nicht sichtbar. Es ist daher nicht sicher, ob er im Laufe der Isolierung als Artefakt entstanden ist. Ein Fleck, der dem U-Fleck entspricht, konnte in Probe a) auch nach präparativer Anreicherung nicht beobachtet werden; es wäre daher auch möglich, dass der Stoff beim Extrahieren des Sekrets im Soxhlet entstanden ist.

³⁷) Kristallisiertes Argentinogenin zeigte unter gleichen Bedingungen ein Maximum bei $289 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,21$ ber. auf $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (416,8)¹⁶). Danach dürfte das amorphe Präparat von N, falls es frei von stark absorbierenden Verunreinigungen war, etwa 50% Argentinogenin enthalten haben.

Bande bei $6,03 \mu$, die für Argentinogenin sehr typisch ist. Die positive FeCl_3 -Reaktion sowie das relativ kurzwellige und sehr hohe Maximum im UV. sind für Argentinogenin äusserst charakteristisch, so dass die Identität höchst wahrscheinlich ist.

Substanz I. Von diesem Stoff wurden nur 10,9 mg eines amorphen Präparates erhalten. Es zeigte im UV. in alkoholischer Lösung ein Absorptionsmaximum bei $292 m\mu$, $\log \epsilon = 3,32$ berechnet auf $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$ (414,43). Sonst konnte es nur durch sein Verhalten im Papierchromatogramm (auch nach Acetylierung) sowie durch die Farbreaktionen charakterisiert werden. Durch direkten Vergleich im Papierchromatogramm (System von Fig. 1 ist besonders geeignet) liess sich zeigen, dass der Stoff von Bufalin, Cinobufagin und Cinobufotalin sicher verschieden ist.

Substanz U. Dieser Stoff wurde nur aus Probe b) erhalten und ist nur durch sein Verhalten im Papierchromatogramm und die SbCl_3 -Färbung charakteristisch³⁸⁾.

Jamaicobufagin (B1). Dieser vermutlich neue Stoff wurde aus beiden Proben in Kristallen isoliert. Er ist schwer von Hellebrigenol (B2) und auch von Gamabufotalin (C) trennbar. Das Acetylderivat lässt sich dagegen im Papierchromatogramm leicht von Di-O-acetyl-hellebrigenol trennen, nicht aber von Di-O-acetyl-gamabufotalin. In reiner Form ist Jamaicobufagin aber schon durch seine auffallende Färbung mit SbCl_3 leicht erkennbar³⁹⁾. Der Stoff kristallisiert relativ schwer. Die Kristalle aus den zwei Proben zeigten verschiedene Smp.⁴⁰⁾, waren aber nach Papierchromatogramm und Farbreaktionen identisch. Für eine Analyse war die Menge nicht ausreichend. Das UV.-Absorptionsspektrum musste mit einem amorphen Präparat aufgenommen werden. Es zeigte in Alkohol das normale Maximum bei $299 m\mu$, $\log \epsilon = 3,67$ ber. auf $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (416,50). Der Stoff lieferte ein gut krist. O-Acetyl-Derivat, das im UV. (in Alkohol) ein analoges Maximum bei $298 m\mu$, $\log \epsilon = 3,71$ ber. auf $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (458,5) bzw. $\log \epsilon = 3,75$ ber. auf $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (500,54), zeigte. Das IR.-Spektrum (Fig. 10 und 11) zeigt die drei Hauptbanden des Hexadienolidrings bei ca. 5,80; 6,14 und $6,53 \mu$ sehr deutlich, wobei die erste (die auch die Absorption der Acetylgruppen enthält) noch Schultern bei ca. 5,88 und $5,94 \mu$ aufweist. In der CH-Region ist die schwache Hexadienolidbande bei ca. $3,28 \mu$ höchstens durch eine winzige Zacke (Fig. 11) angedeutet. Etwas stärker ist eine kleine Bande bei ca. $3,32 \mu$ in Fig. 11 sichtbar, so dass die Anwesenheit eines 14,15-Epoxydringes nicht ausgeschlossen ist⁴¹⁾. Anhaltspunkte für eine Aldehydgruppe fehlen (es ist nur eine schwache Bande bei ca. 3,59 und nicht bei $3,68 \mu$ sichtbar). Die Anwesenheit einer reaktiven Aldehydgruppe ist auch unwahrscheinlich, weil Jamaicobufagin mit Reagens T nicht reagiert hatte.

Subst. D. Von diesem Stoff wurden nur 8 mg in amorpher Form erhalten. Er konnte nur im Papierchromatogramm, durch die Farbreaktion mit SbCl_3 und durch das UV.-Spektrum charakterisiert werden. Letzteres (in Alkohol) zeigte das normale Maximum bei $299 m\mu$, $\log \epsilon = 3,75$ ber. auf $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (400,5). Für eine solche Formel

³⁸⁾ Leider ging das erhaltene Präparat vorzeitig verloren, so dass weitere Vergleiche unmöglich wurden.

³⁹⁾ Es gibt dabei schon in der Kälte eine deutliche Gelbfärbung, die beim Erhitzen in Grün umschlägt. Alle bisher bekannten Bufogenine färben sich erst beim Erhitzen.

⁴⁰⁾ Smp. $164\text{--}173^\circ$ aus Probe a); Smp. $167\text{--}172/210\text{--}220^\circ$ oder $217\text{--}220^\circ$ aus Probe b).

⁴¹⁾ Zur sicheren Erkennung wäre die Aufnahme in höherer Konzentration nötig und womöglich vorherige Hydrierung des Hexadienolidrings, vgl. SCHRÖTER u. Mitarb.⁸⁾.

ist die Laufstrecke im Papierchromatogramm aber auffallend kurz. Nach dem Verlauf der Trennung bei Behandlung mit Reagens T scheint Subst. D eine reaktive Carbonylgruppe (Aldehyd?) zu enthalten.

Diskussion der Ergebnisse. Die erhaltenen Resultate bestätigen die früheren Ergebnisse²⁻⁵), wonach im Sekret von *Bufo marinus* das Marinobufagin sehr stark überwiegt, gefolgt von Telocinobufagin. Die von SCHRÖTER und Mitarb.⁸⁾ auf Grund papierchromatographischer Resultate vermuteten drei Begleiter (Hellebrigenin,

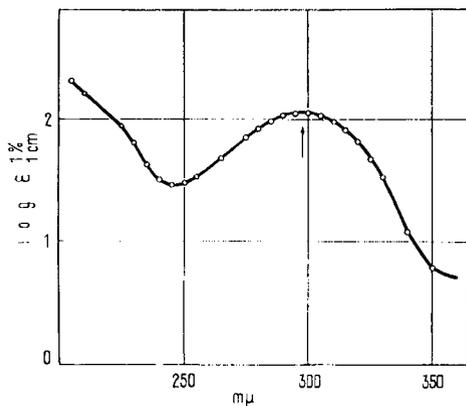


Fig. 9. UV.-Absorptionsspektrum von *O*-Acetyl-jamaicobufagin (*Ac-B*₁), Smp. 162–178°, in Alkohol⁴²⁾, Maximum bei 298 mμ, $\log \epsilon_{1\%}^{1\text{cm}} = 2,05$

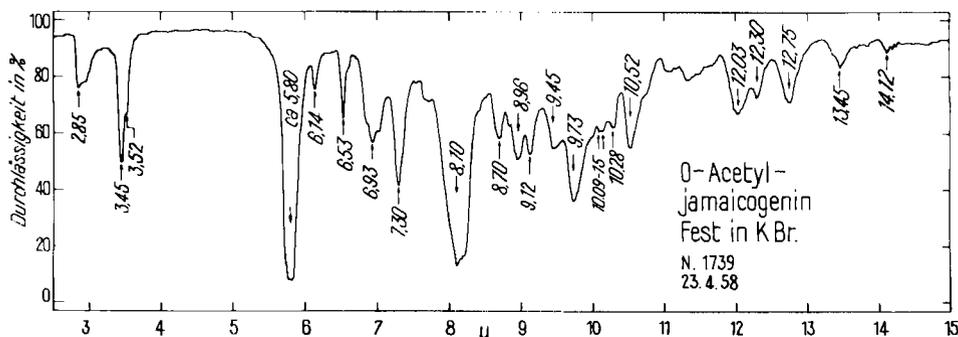


Fig. 10. IR.-Absorptionsspektrum von *O*-Acetyl-jamaicobufagin (*Ac-B*₁), Smp. 162–178°, fest (0,88 mg) in KBr, nicht vibriert, aufgenommen mit NaCl-Prisma⁴³⁾

Gamabufotalin und Hellebrigenol) konnten in kleinen Mengen isoliert und eindeutig identifiziert werden. Von den daneben jetzt noch aufgefundenen weiteren Geninen ist Bufalin in relativ grosser Menge enthalten. Es wurde bei der Prüfung im Papierchromatogramm⁸⁾ früher übersehen, da es in den benützten Systemen sehr ähnlich läuft wie Marinobufagin und von diesem verdeckt wurde.

⁴²⁾ Aufgenommen von den Herren K. STICH und G. ROTZLER auf einem UNICAM SP 500 Spectrophotometer mit Sekundärelektronenvervielfacher IP 28.

⁴³⁾ Aufgenommen von den Herren K. STICH und G. ROTZLER auf einem PERKIN-ELMER IR.-Spectrophotometer, Modell 21.

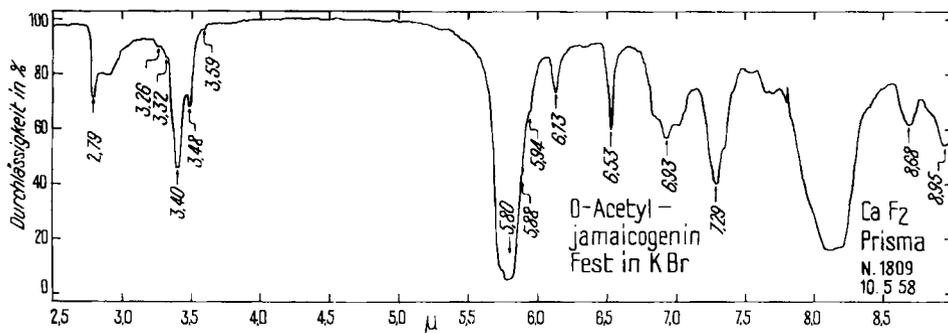


Fig. 11. IR-Absorptionsspektrum von *O*-Acetyl-jamaicobufagin (*Ac-B*₁), Smp. 162–178°, fest (0,88 mg) in KBr, nicht vibriert, aufgenommen mit CaF₂-Prisma⁴³⁾

Von Interesse ist der Vergleich mit dem Sekret von *Bufo arenarum*¹⁶⁾. Von den hier isolierten 11 Geninen wurden 7 auch in *B. arenarum* aufgefunden, auch dort waren Marinobufagin und Telocinobufagin relativ reichlich vorhanden. Sonst ist aber die prozentuale Zusammensetzung sehr stark verschieden. Arenobufagin, eines der Hauptgenine von *B. arenarum* konnten wir in *B. marinus* bisher nicht auffinden. Dieser Stoff wird aber durch Kontakt mit Al₂O₃ langsam in Argentinogenin und Bufarenogin umgelagert¹⁶⁾. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die kleine Menge Argentinogenin, die wir hier isolieren konnten, wenigstens teilweise bei der wiederholten Chromatographie an Al₂O₃ aus Arenobufagin entstanden ist.

Der eine von uns (M. B.) dankt dem *Centre National de la Recherche Scientifique*, Paris, für die Unterstützung, welche ihm die Beteiligung an dieser Arbeit ermöglichte. Ferner dankt H. S. der F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, Basel, für finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis 200° etwa ± 2°, darüber etwa ± 3°. Substanzprobe zur Bestimmung der Drehung und zur Aufnahme der UV.- und IR.-Spektren 1 Std. bei 70° und 0,05 Torr getrocknet. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chloroform oder Chloroform-Äther-(1:3), Waschen mit 2-n. HCl (zweimal), 2-n. Na₂CO₃ (zweimal) und Wasser (zweimal), Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum. Die Absorptionschromatogramme wurden nach der Durchlaufmethode⁴⁴⁾ an alkalifreiem Al₂O₃ («MERCK» standartisiert nach BROCKMANN) oder Silicagel⁴⁵⁾ durchgeführt. Die Ausführung der Papierchromatogramme¹⁷⁾ und der Farb-reaktion mit H₂SO₄⁴⁶⁾ nach früheren Angaben. Es gelten die folgenden Abkürzungen: Ae = Äther, (Ac)₂O = Acetanhydrid, AcOH = Eisessig, Alk = 95-proz. Äthanol, An = Aceton, Be = Benzol, Chf = Chloroform, Cy = Cyclohexan, Me = Methanol, ML = eingedampfte Mutterlauge, n. u. = nicht untersucht, Pchr = Papierchromatogramm und Papierchromatographie, Pgl = Propylenglykol, Pn = Pentan, Py = Pyridin, W = Wasser.

a) Untersuchung der Probe a)

Vortrennung von 105 g getrocknetem Drüsensekret von *Bufo marinus* (Probe vom Juni 1956 von Jamaica) durch grobe Verteilungschromatographie¹⁰⁾. – (ausgeführt Oktober 1957 von M. B.). – 105 g trockenes Sekret (hellbraunes Material von salbenartiger

⁴⁴⁾ T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Disc. Transact. Faraday Soc. 7, 305 (1949).

⁴⁵⁾ Silicagel engporig 0,15–0,3 mm gekörnt für Chromatographie nach BENDER & HOBEIN AG., Zürich.

⁴⁶⁾ J. v. EUW & T. REICHSTEIN, Helv. 31, 883 (1948).

Konsistenz) wurden im Mörser mit 760 ml W möglichst homogenisiert und anschliessend mit 400 g gereinigtem⁴⁷⁾ Kieselgur vermischt. Das so erhaltene Pulver wurde mit frisch dest. Chf auf die mit Chf bereitete Säule (Nr. 4)⁴⁷⁾ gebracht, die mit 2 kg Kieselgur-W-(1:1)⁴⁸⁾ beschickt war. Anschliessend wurde mit Chf sowie Chf-Bu-Gemischen (jeweils mit W gesättigt) chromatographiert. Laufgeschwindigkeit ca. 600 ml pro 12 Std. Über die Ausbeuten orientiert Tab. 6.

Tabelle 6. Grobe Verteilungschromatographie von 105 g Trockensekret

Fraktions-Nr.	Eluiermittel		Eindampfrückstand der Eluate		
	Art	Menge in l	Menge in mg	Flecke im Pchr ⁴⁹⁾ 50) 51)	Weitere Verarbeitung
1	Chf	0,6	31	M (T)	15,629 g zur Al ₂ O ₃ -Chromatographie 2. Port. (Tab. 8)
2	„	„	767		
3	„	„	10287		
4	„	„	4544		
5	„	„	919	M, T u. kürzere ⁵²⁾	1,509 g zur Al ₂ O ₃ -Chromatographie 1. Portion (Tab. 7)
6	„	„	283		
7	„	„	177		
8	„	„	130		
9	„	„	88		0,157 g zur Al ₂ O ₃ -Chromatographie 2. Portion (Tab. 8)
10	„	„	37		
11	„	„	32		
12	„	„	5	n. u.	vereinigt mit 16, n. u.
13	Chf-Bu-(9:1)	1,8	82		
14	„ „ (8:2)	„	105		
15	„ „ (1:1)	3,6	50		
16 = Rest	Me ⁵³⁾	20,0	33763	n. u.	vermutl. Bufotoxine n. u.

Die Fr. 13–15 (dunkles Harz) wurden mit Fr. 16 vereinigt (n. u.).

Die Fr. 16 (33,763 g dunkelbraunes Harz) dürfte die Hauptmenge der Toxine sowie der Basen enthalten haben (n. u.).

Die Fr. 1–12 wurden in 2 Portionen an Al₂O₃ chromatographiert, vgl. Tab. 7 und Tab. 8.

Aus dieser Chromatographie resultierten somit 448 mg reines M2. Die Verarbeitung der weiteren Anteile ist aus der letzten Kolonne der Tab. 7 ersichtlich. Die nicht untersuchte Fr. 30 dürfte noch kleine Mengen A, B, C und D enthalten haben.

Aus dieser Chromatographie resultierten 5,262 g krist. M2. Verarbeitung der ML und weiterer Fraktionen vgl. letzte Kolonne. Die n. u. Anteile der Fr. 13 und 14 dürften noch ca. 450 mg M2, 90 mg T und ca. 5 mg B und 5 mg C enthalten haben.

Für die folgende Chromatographie (Tab. 9) dienten die 18 mg ML der Fr. 27–29 von Tab. 7, 909 mg ML der Fr. 13–15 von Tab. 8, sowie die 328 mg Fr. 16–18 von Tab. 8. Dieses Material (total 1,231 g) enthielt vorwiegend M2, T sowie etwas A, B, C und D.

Für die anschliessende Chromatographie (Tab. 10) diente das folgende Material: 545 mg ML der Fr. 6–22 von Tab. 7, 140,5 mg Fr. 23–26 von Tab. 7, 60 mg Kristalle Fr. 27–29 von Tab. 7,

47) H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. **36**, 357 (1953).

48) Hier handelt es sich um das Verhältnis der Gewichtsteile.

49) Nachweis durch UV.-Photokopie¹²⁾ sowie Entwicklung mit SbCl₃¹³⁾ 14) 15).

50) In Klammern = schwache Flecke.

51) In dieser Phase wurde nur eine rohe Orientierung angestrebt.

52) Flecke mit kürzeren Laufstrecken, entspr. höher polaren Stoffen.

53) Der Inhalt der Säule wurde 5mal mit je 4 l Me bei 20° je 3 Tage geschüttelt.

Tabelle 7. *Chromatogr. Trennung der 1. Portion (1,509 g Fr. 5–8 von Tab. 6) an 45 g Al₂O₃, Isolierung von M₂*

Fraktions-Nr.	Eluiermittel je 150 ml	Eindampfrückstand					
		roh		Kristalle aus An-Ae			Endprodukte oder weitere Verarbeitung
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr	
1–2	Be	22,5					
3	Be-Chf-(9:1)	5,5	UV. negativ				
4	„ „ „	47,0	„ „	8	123–127°		vermutl. Sterine n. u.
5	„ „ „	4,0	„ „				
6	„ „ „	5,0			217–227°	M2	448 mg reines M2 Endprod. ML (545 mg) Tab. 10
7	„ „ „	3,5		—			
8–14	„ „ -(4:1)	589		448	220–222°	M2	
15–20	„ „ -(3:2)	384			220–222°	M2	} Tab. 10
21–22	„ „ -(2:3)	52			216–220°	M2	
23	„ „ „	10,5	M2, T, A		209–218°	M2, T, A	} Krist. u. ML zu Tab. 10
24–25	Chf	109			174–205°	M2, T, A	
26	„	21			206–209°	M2, T, A	} Die 60 mg Krist. zu Tab. 10
27	„	16			201–209°	M2, T, A u. kürzere ⁵²⁾	
28	„	13			174–182°	M2, T, A, B	} Dic ML (18 mg) zu Tab. 9
29	Chf-Me-(99:1)	49	(M2), (T) A B, C, D		147–151°	(M2) (T) A, B, C, D	
30	„ „ „	25	n. u.	—	amorph		n. u.
31	„ „ „	9	(A) B,	—	„		} 41 mg zur Gruppe 5
32–34	„ „ -(9:1)	18	C, D	—	„		
35–36	Me ⁵³⁾	14		—	„		} Tab. 16

2010 mg ML der Fr. 6–9 von Tab. 8⁵⁴⁾, 3144 mg Fr. 10–11 von Tab. 8, 503 mg ML der Fr. 12 von Tab. 8, 200 mg Kristalle der Fr. 15 von Tab. 8, 823 mg Fr. 2–6 von Tab. 9, sowie noch 14,3 mg Fr. 8–13 der Tab. 15 (vgl. Trennung der Gruppe 3). Dieses Material (5,516 g) enthielt vorwiegend M1, M2 und T.

Dieses Chromatogramm ist leider nicht fertig eluiert worden. Reste von A, B, C und D (total ca. 50–100 mg) dürften auf der Säule verblieben sein.

Die n. u. Fr. 11–14 und 32–37 sowie die ML der Fr. 15–31 dürften schätzungsweise 50 mg M1, 200 mg M2 und ca. 300 mg T enthalten haben.

Die 276 mg Fr. 38–43 von Tab. 10 wurden für sich chromatographiert (Tab. 11).

Die nicht getrennten Fr. 15–24, die ML von 25–31 und die Fr. 32–41 enthielten schätzungsweise 10 mg M2, 80 mg T und Spuren B1.

Trennung der Gruppe 1: Isolierung von R, L und M₁. – Als Gruppe 1 wurden die 752 mg Fr. 4 und 5 der Tab. 8 bezeichnet; sie enthielten R, L, M1 und M2. 751 mg davon wurden zunächst an 23 g Al₂O₃ chromatographiert (vgl. Tab. 12).

Die n. u. ML der Fr. 10–14 enthielt schätzungsweise noch ca. 20 mg M1 sowie ca. 0,7 mg R und 0,4 mg L.

Die Kristalle aus Fr. 6–7 und 8–14 (total 69,6 g) gaben an An-Ae 24,9 mg reines M1.

Die 503 mg ML der Fr. 5–9 von Tab. 12 wurden zunächst nochmals an 25 g Al₂O₃ chromatographiert. Keine Fraktion war einheitlich, alle zeigten die Flecke R, L und M1. Von dem UV.-

⁵⁴⁾ Bei diesem Gewicht muss ein Wägefehler vorliegen, der nicht mehr korrigiert werden konnte, weil das Material nicht mehr vorhanden war.

⁵⁵⁾ Gemisch gleicher Teile Chf, Me und Äthylacetat.

Tabelle 8. *Chromatogr. Trennung der 2. Portion (Fr. 1-4 und 9-12 von Tab. 6, total 15,786 g) an 450 g Al₂O₃, Isolierung von M2*

Fraktionen-Nr.	Eluiermittel je 1000 ml	Eindampfrückstand					Endprodukte oder weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle aus An-Ae			
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr	
1-2	Be-Chf-(9:1)	73	UV. negativ	—			vermutl. Sterine usw. n. u.
3	„ „ „	34	„ „	—			
4	„ „ „	101	K(L)M1, M2	—			Krist. + ML = Gruppe 1
5	„ „ -(3:2)	651	K(L)M1, M2	?	200-232°	M1, M2	
6-8	„ „ „	4501		} 5262	217-220°	M2	} 5262 g krist. M2 } Endpr.; ML (2,01 g) } ⁵⁴ zu Tab. 10
9	Chf	2331			213-218°		
10-11	„	3144	M2, T		191-197°	M2, T	} Krist. + ML zu T. 10 } Krist. = Gruppe 2 } ML zu Tab. 10
12	„	818	M2, T	315	191-197°	(M2) T	
13	Chf-Me-(98:2)	1013		305	188-197°	M2, T, B, C	} Krist. n. u. } ML zu Tab. 9
14	„ „ „	420		250			
15	„ „ „	223		200	194-199°	M2, T, B, C	} Krist. zu Tab. 10 } ML zu Tab. 9
16	„ „ „	110	M2, T, A, B, C	—	—		
17-18	„ „ -(9:1)	218	M2, T, A, B, C,	—	—		} zu Tab. 9
19	„ „ „	23	} (A), B, C	—	—		
20	Gemisch ⁵⁵)	24		—	—	—	

Tabelle 9. *Chromatographie von 1,231 g Gemisch (M2, T, A, B, C, D) an 40 g Al₂O₃*

Fraktionen-Nr.	Eluiermittel je 130 ml	Eindampfrückstand					Endprodukte oder weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle aus An-Ae			
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr	
1	Be-Chf-(2:3)	37	UV. neg.	—			} n. u. } 823 mg Krist. } u. ML zu Tab. 10
2-3	„ „ „	630		415	202-214°	M2, T	
4	„ „ „	88		46	188-200°		} 103 mg Krist. } = Gruppe 3
5-6	„ „ -(1:4)	105		62	185-196°	M2, T(B)	
7-8	Chf	105		31	182-186°	M2, T(B)	} 160 mg ML } = Gruppe 4
9	Chf-Me-(99,5:0,5)	40		24	168-176°	T (B)	
10-12	„ „ „	131		48	149-153°	(M2) (T) A, B	} zu Gruppe 5
13-14	„ „ -(97:3)	25	} (M2), T, } A, B, C	—	—	—	
15-17	„ „ -(95:5)	23		—	—	—	

positiven Material (473 mg) wurden 468 mg durch Verteilungschromatographie (vgl. Tab. 13) getrennt. Hierzu diente eine Säule Nr. 1⁴⁷⁾, die mit einer Mischung von 125 g gereinigtem⁴⁷⁾ Kieselgur (Hyflo-Super-Cel) und 125 ml Pgl-W-(4:1) in Be suspendiert gefüllt war. Laufgeschwindigkeit ca. 6,25 ml pro Std. Die erhaltenen Fraktionen (je 30 ml mit automatischem

Tabelle 10. *Chromatographie von 5,516 g Gemisch an 170 g Al₂O₃, Isolierung von M1 und M2*

Fraktions-Nr.	Eluiermittel je 600 ml	Eindampfrückstand					Endprodukte oder weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle aus An-Ae			
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr	
1-4	Be	0		—			
5-7	Be-Chf-(9:1)	16	UV. negativ	—			n. u.
8-10	„ „ „	330	M1	281	242-246°	M1	Endpr.; ML n. u.
11	„ „ „	8,4	M1, M2				
12-14	„ „ -(8:2)	136,4	M1, M2	2540	219-223°	M2	} 144,8 mg } n. u. } Endpr.; ML } (719 mg) n. u.
15-25	„ „ -(7:3)	2304	M2				
26-31	„ „ -(3:2)	955	M2				
32	„ „ „	70	M2 (T)				
33-36	„ „ -(2:3)	411	M2, T				
37	Chf	419	M2, T				} 900 mg } n. u.
38-43	„	276	(M2) T				Chrom. Tab. 11
Total		4925					

Tabelle 11. *Chromatographie von 276 mg Fr. 38-43 von Tab. 10 an 17 g Al₂O₃, Isolierung von T*

Fraktions-Nr.	Eluiermittel je 30 ml	Eindampfrückstand					Endprodukte oder weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle aus An-Ae			
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr	
1-4	Be-Chf-(9:1)	0					
5-8	„ „ -(4:1)	Spur					
9-12	„ „ -(7:3)	„					
13-14	„ „ -(3:2)	6,9					
15-16	„ „ -(3:2)	18,9	(M2) T	89,2	212-217°	M2, T	nicht getrennt
17-24	„ „ -(1:1)	97	(M2) T				
25	„ „ -(1:1)	7,6	T	30,2	202-214°	T	Endpr. ML n. u.
26-30	„ „ -(2:3)	38,6	T				
31	Chf	12,7	T				
32-41	„	72,5	T, (B1)				Mikro-acetylier. nicht getrennt

Sammler aufgefangen) wurden einzeln im Vakuum eingedampft, der Rückstand zur Entfernung von Pgl in ca. 6 ml Chf gelöst und zweimal mit je 5 ml 10-proz. KHCO₃, einmal mit 3 ml W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, eingedampft und gewogen.

Die n. u. Anteile dürften noch ca. 30 mg M1 enthalten haben.

Die Fr. 5-12 (zusammen 95,3 mg) wurden auf insgesamt 30 Papierblättern⁵⁶⁾ im System Cyclohexan-Be-(5:7)/Fmd getrennt. Die Blätter wurden herausgenommen, knapp bevor die Front den unteren Rand erreicht hatte. Erhalten wurden: 58,1 mg rohes, von Fmd befreites

⁵⁶⁾ WHATMAN-Papier Nr. 1, Grösse 19×46 cm; Ausführung nach E. v. ARX & R. NEHER, Helv. 39, 1664 (1956).

Tabelle 12. *Chromatographie von 751 mg Gruppe 1 an 23 g Al₂O₃*

Fraktions-Nr.	Eluiermittel je 80 ml	Eindampfrückstand					Endprodukt oder weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle aus An-Ae			
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr	
1-3	Be	13,2	UV. negativ			—	n. u.
4	Be-Chf-(9:1)	4,3	UV. negativ			—	n. u.
5	„ „ „	26	R, L, M1, M2	8	200–220°	M2	Krist. — M2 und M1 = Endprod. ⁵⁷⁾
6	„ „ „	259	R, L, M1, M2		220–234°	M1	
7	„ „ „	194,8	R, L, M1, M2	39	208–232°	M1	ML (503 mg) zur Verteil. Tab. 13
8-9	„ „ „	193,6	R, L, M1, M2		215–236°	M1	
10-12	„ „ „-(8:2)	28,7	(R) (L) M1		223–236°	M1	
13-14	„ „ „-(1:1)	?		225–238°	M1		
15	„ „ „	1,2		—	—		n. u.
16–18	Chf	5		—	—		n. u.

Tabelle 13. *Verteilungschromatographie von 468 mg Gemisch von K, L und M1*

Fraktions-Nr.	Eluiermittel je 30 ml ⁵⁸⁾	Eindampfrückstand von Pgl befreit					Endprodukt oder weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle aus An-Ae			
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr	
1-4	Be	65,2	UV. negativ SbCl ₃ „				} zusammen 95,3 mg Präp. Pchr
5	„	16,7	UV. negativ				
6-7	„	33,9	R (L)				
8-9	„	27,8	R (L)				
10-12	„	16,1	R, L				
13-15	„	1,5					n. u.
16-25	Be-Chf-(9:1)	5,3					n. u.
26-49	„ „ „	219	M1	151	242–248°	M1	Krist. M1 = Endprodukt. ML n. u.
50-59	„ „ „-(4:1)	15,6					n. u.
60-70	„ „ „-(1:4)	1,5					n. u.

Eluat⁵⁹⁾ der R-Zone und 10,9 mg rohes, von Fmd befreites Eluat⁵⁹⁾ der L-Zone. Das L-Eluat wurde nicht weiter gereinigt. Es war papierchromatographisch einheitlich.

Die 58,1 mg Eluate der R-Zone wurden an 2 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Be-Chf-(96:4) eluierten Anteile (41,9 mg) gaben aus An-Ae 2 mg Resibufogenin in farblosen kleinen Klötchen mit Doppel-Smp. 120–130/200–218°. Die ML dienten zur Acetylierung.

Trennung von Gruppe 2: Isolierung von T. — Als Gruppe 2 wurden die 315 mg Kristalle aus Fr. 12 von Tab. 3 bezeichnet, die neben wenig M2 vorwiegend T enthielten. Dieses Material wurde an 10 g Al₂O₃ chromatographiert (vgl. Tab. 14).

In diesem Material sind demnach schätzungsweise total 100 mg Marinobufagin (M2) und 200 mg Telocinobufagin (T) enthalten gewesen.

⁵⁷⁾ Diese Kristalle von M1 enthielten noch eine Spur M2.

⁵⁸⁾ Mit Pgl-W-(1:4) fast gesättigt.

⁵⁹⁾ Von Fmd befreit durch Aufnahme in Chf und Ausschütteln mit 10-proz. KHCO₃-Lösung und W, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum.

Tabelle 14. *Chromatographie von 315 mg Kristallen aus Fr. 12 (Tab. 3), Isolierung von T*

Fraktions-Nr.	Eluiermittel je 30 ml	Eindampfrückstand					Endprodukt oder weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle aus An-Ae			
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr	
1-3	Bc-Chf-(1:1)	258	M2, T	191	195-208°	M2, T	n. u.
4-5	„ „ „	26	(M2), T	17	201-206°	(M2) T	Endpr.
6-7	„ „ -(1:4)	24	T	18	201-209°	T	Endpr.
8-9	Chf	Spur		—	—		
10-11	Chf-Me-(95:5)	„		—	—		

Trennung der Gruppe 3. – Als Gruppe 3 wurden die 103 mg Kristalle der Fr. 7-12 von Tab. 9 bezeichnet. Sie enthielten vorwiegend M, T, A und B1 und wurden zunächst in 2 Portionen mit Reagens T getrennt.

Trennung der ersten Portion. 57 mg Kristalle aus Fr. 7-9 von Tab. 9 wurden in 1 ml Me gelöst, mit 55 mg reinstem Reagens T³¹) und 0,2 ml AcOH versetzt und 24 Std. stehengelassen. Dann wurde bei -5° mit 95% der zur Neutralisation des Eisessigs nötigen Menge NaOH in Eiswasser versetzt und bei -5° dreimal mit je 5 ml Chf ausgeschüttelt. Die mit W und KHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge lieferten 45,8 mg aldehydfreies Material (Pchr: M2, T, B1). Die wässrige Phase und das erste Waschwasser wurden im Vakuum von Me befreit, mit konz. HCl auf pH = 1 gebracht, mit 20 ml Chf versetzt und 5 Tage auf der Maschine geschüttelt. Dann wurde das Chf abgetrennt, die wässrige Phase erneut mit 20 ml frischem Chf versetzt und wiederum 5 Tage auf der Maschine geschüttelt. Diese Behandlung wurde noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Chf-Lösungen wurden mit W und KHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Sie lieferten 3,6 mg Aldehydfraktion.

Trennung der zweiten Portion. Die 40,5 mg Kristalle aus Fr. 10-12 von Tab. 9 wurden genau gleich behandelt und gaben 14,5 mg aldehydfreies Material sowie 6 mg Aldehydfraktion.

Verarbeitung der Aldehydfractionen: Isolierung von Hellebrigenin (A). Die Aldehydfractionen aus beiden Portionen wurden vereinigt (9,5 mg). Dieses Material zeigte im Pchr den A-Fleck und gab aus An-Ae 4,8 mg krist. Hellebrigenin in farblosen Körnern vom Smp. 150-155°.

Verarbeitung der aldehydfreien Teile: Isolierung von B1. Die aldehydfreien Anteile aus beiden Portionen wurden vereinigt (60,3 mg) und an 2 g Al₂O₃ chromatographiert (vgl. Tab. 15).

Wir schätzen, dass die n. u. Fr. 14-16 noch ca. 7 mg T und ca. 3 mg B1 enthalten haben.

Die ML der Fr. 17-21 (9,5 mg), die Fr. 22-27 (ca. 1,5 mg) sowie die zweite Kristall-ML der Fr. 17-21 wurden acetyliert (vgl. bei Jamaicobufagin).

Trennung der Gruppe 4: Versuch zur Isolierung weiterer Mengen von B1. – Als Gruppe 4 wurden die 160 mg ML der Fr. 7-12 von Tab. 9 bezeichnet. Sie gaben im Pchr die Flecke M2, T und B1. Dieses Material wurde auf 40 Papierbogen⁵⁶) im System Chf/Fmd präparativ getrennt. Laufdauer 3 Std. Die untersuchten Eluate wurden wie oben (vgl. Gruppe 1) von Fmd befreit. Die M2- und T-Zonen wurden n. u. (dieses Material dürfte ca. 40 mg M2 und 40 mg T enthalten haben). Die B1-Zonen wurden geteilt in eine obere Hälfte (etwas stärker polares Material) und in eine untere Hälfte (etwas weniger polares Material). Die obere lieferte 30,5 mg rohes Eluat (von Fmd befreit) und die untere 54 mg analoges Eluat. Beide zeigten im Pchr aber denselben B1-Fleck mit entsprechender SbCl₅-Färbung.

Die 30,5 mg Eluat aus der oberen Hälfte wurden an 1,2 g Silicagel chromatographiert. Die folgenden mit Chf-Me-Gemischen vom angegebenen Gehalt erhaltenen Eluate (96:4) (4,5 mg), (94:6) (6,5 mg) und (90:10) (7,2 mg), total somit 18,2 mg, zeigten im Pchr alle den B1-Fleck, lieferten aber keine Kristalle.

Das Eluat aus der unteren Hälfte (54 mg) wurde an 1,5 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Chf eluierten Anteile (10,6 mg) zeigten im Pchr ebenfalls nur den B1-Fleck und gaben bisher keine Kristalle.

Tabelle 15. *Chromatographie von 60,3 mg aldehydfreien Anteilen von Gruppe 3 an 2 g Al₂O₃*

Fraktions-Nr.	Eluiermittel je 5 ml	Eindampfrückstand					Endprodukt oder weitere Verarbeitung	
		roh		Kristalle aus An-Ae				
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr		
1-4	Be-Chf-(9:1)	0						
5-7	„ „ -(7:3)	1						
8-9	„ „ -(2:3)	6,0			190-204°	M, T	} zu Tab. 10	
10-13	„ „ - „	8,3			202-207°	M, T		
14	„ „ -(1:4)	8			194-198°	T, B1		n. u.
15-16	„ „ „	2,5			170-185°	T, B1		n. u.
17-21	Chf	11,1	(T) B1	1,6	162-170°	B1	Krist.=Endpr.; ML zur Acetylierung	
22-23	„	1					} acetyliert	
24-27	Chf-Mc-(99:1)	0,5						
28-30	„ „ -(98:2)	0,5						n. u.
31-32	„ „ -(96:4)	0,5						n. u.
33-34	„ „ -(9:1)	0,5					n. u.	
35-36	„ „ -(8:2)	0,5					n. u.	

Tabelle 16. *Chromatographie von 123 mg Gruppe 5 an 6,7 g SiO₂*

Fraktions-Nr.	Eluiermittel je 15 ml	Eindampfrückstand					Endprodukt oder weitere Verarbeitung
		roh		Kristalle aus An-Ae			
		Menge in mg	Flecke im Pchr	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pchr	
1-5	Be-Chf-(1:4)	2,5					
6-8	Chf	17,3	UV. negativ				
9	„	8		5	212-220°	M2	Endpr.
10-11	„	6,5	M2, N	—			n. u.
12-15	„	6,6	N	—			Endpr.
16-18	Chf-Mc (99:1)	2	N, T	—			n. u.
19-22	„ „ „	5,4	T	2	130-155°	T	Endpr.
23-25	„ „ -(98:2)	5	A, B2		80-120°		} Krist. + ML total 41 mg getrennt mit Reagens T
26-31	„ „ „	18,9	A, B2, C		139-160°		
32-34	„ „ „	5,5	B2, C, D		146-155°		
35-38	„ „ -(97:3)	7,8	B2, C, D	—			
39-41	„ „ „	3	C (D)	—			
42-46	„ „ -(95:5)	5	D	—			Endpr.
47-50	„ „ -(92:8)	2,5	D	—			Endpr.
51-54	„ „ -(85:15)	Spur					
55-57	„ „ -(1:1)	„					

Die beiden chromatographisch gereinigten Eluate wurden vereinigt (28,8 mg) in An gelöst und durch eine dünne Schicht Kohle filtriert. Das klare farblose Filtrat gab beim Eindampfen 19 mg Jamaicaobufagin als farbloses Harz.

Trennung der Gruppe 5: Isolierung von B2, C, N und D. — Als Gruppe 5 bezeichnen wir die vereinigten Fr. 31-36 von Tab. 7, Fr. 19-20 von Tab. 8 und Fr. 13-17 von Tab. 9.

Dieses Material (123 mg) zeigte im Pchr besonders die Flecke (A), B2, C und D, enthielt aber noch M2 und T⁶⁰). Es wurde an 6,2 g Silicagel chromatographiert (vgl. Tab. 16).

Die n. u. Fr. 10–11 enthielten schätzungsweise 5 mg M2, 2,5 mg N und 2 mg T.

Die Fr. 42–50 konnten nicht kristallisiert werden, sie stellen das bisher beste Präparat von Subst. D dar.

Die Fr. 23–41 von Tab. 16 (Kristalle und ML zusammen 41 mg) wurden genau wie bei Gruppe 3 beschrieben mit 55 mg Reagens T umgesetzt. Die Aufarbeitung lieferte 36 mg aldehydfreie Anteile⁶¹), die im Pchr nur noch die Flecke B2 und C gaben. Sie wurden auf 12 Papierblättern (WHATMAN Nr. 1) im System Chf/Fmd (Dauer 3 $\frac{1}{2}$ Std.) präparativ getrennt. Die untersuchten Eluate wurden wie bei Gruppe 1 von Fmd befreit. Erhalten wurden 7,9 mg Eluat der B2-Zonen und 7 mg Eluat der C-Zone.

Die 7,9 mg B2-Eluat gaben aus An-Ae 1,8 mg krist. Hellebrigenol (= B2) in farblosen Körnern vom Smp. 144–150°. Die ML (6,1 mg) wurde an 0,4 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Chf-Me-(99:1), -(98:2) und -(97:3) eluierten Anteile (2,4 mg farbloses Harz) zeigten im Pchr nur den B2-Fleck und mit SbCl₃ die entsprechende Färbung.

Die 7 mg C-Eluat wurden an 0,4 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Chf-Me-(99:1) und -(98:2) eluierbaren Anteile (4,6 mg farbloses Harz) gaben im Pchr nur den C-Fleck und die entspr. Färbung, 4,3 mg dieses amorphen Materials dienten zur Acetylierung (s. u.).

Beschreibung und Identifizierung der aus Probe a) isolierten Stoffe. – R = *Resibufogenin*. Die 2 mg Kristalle (vgl. Gruppe 1) waren nach Pchr und Färbung mit SbCl₃ identisch mit authentischem Material.

3-O-Acetyl-Derivat von R. 37,5 mg amorphe ML der obigen Kristalle wurden mit 0,4 ml abs. Py und 0,35 ml (Ac)₂O 24 Std. auf 37° erwärmt. Übliche Aufarbeitung gab 38,4 mg neutrales Rohprodukt. Aus An-Ae 28,6 mg farblose Plättchen, Smp. 223–234°. Nach Umkristallisieren Smp. ebenso, $[\alpha]_D^{25} = -1,8^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,1 in Chf). Nach Mischprobe und Pchr (n-Heptan-Be-(9:1)/Fmd) identisch mit authentischem Material.

Subst. L. Das aus Fr. 5–12 von Tab. 13 nur in sehr kleiner Menge isolierte amorphe Präparat gab mit 84-proz. sowie konz. H₂SO₄ eine gelbbraune Färbung, die 24 Std. bestehen blieb. Laufstrecke im Pchr vgl. Fig. 1.

O-Acetyl-Derivat von L. 1 mg amorphe Subst. L wurde mit 0,15 ml abs. Py und 0,1 ml (Ac)₂O 16 Std. auf 37° erwärmt. Dann wurde im Vakuum eingedampft und getrocknet. Der Rückstand diente zur Pchr (Fig. 8).

M1 = Bufalin. Das aus Fr. 26–49 von Tab. 13 erhaltene Präparat gab aus An-Ae farblose vierkantige Prismen, Smp. 230°/242–248°, $[\alpha]_D^{25} = -6,7^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,2 in Chf). Nach Mischprobe und Pchr (Be-Chf-(9:1)/Fmd) identisch mit authentischem Material.

3-O-Acetyl-Derivat von M1. 22,5 mg krist. M1 gaben nach Acetylierung 24,1 mg neutrales Rohprodukt. Aus An-Ae 16,6 mg farblose Plättchen, Smp. 236–247°, $[\alpha]_D^{25} = -6,0^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Chf), auch nach Mischprobe identisch mit authentischem Material.

M2 = Marinobufagin. Aus An-Ae farblose viereckige Plättchen, Smp. 215–220°, $[\alpha]_D^{24} = +10,2^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,17 in Chf).

3-O-Acetyl-Derivat von M2. 50 mg krist. M2 gaben 53,5 mg rohes Acetat. Aus An-Ae 47 mg farblose Nadeln, Smp. 200–220°, $[\alpha]_D^{26} = +24,9^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Chf). Die Mischprobe mit authentischem Material schmolz gleich.

N = Argentinogenin. Dieser aus Fr. 12–15 von Tab. 11 nur in kleiner Menge und in amorpher Form isolierte Stoff war nach Pchr und Färbung mit SbCl₃ mit authentischem Material identisch. Er gab mit FeCl₃ eine graublauere Färbung.

3-O-Acetyl-Derivat von N. 0,5 mg wurde wie üblich acetyliert. Das Rohprodukt war nach Pchr (Fig. 8) und Farbreaktionen (Tab. 1 und 3) identisch mit authentischem (amorphem) Material.

T = Telocinobufagin. Aus An-Ae farblose Prismen, Smp. 201–208°, $[\alpha]_D^{25} = +5,5^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,4 in Chf). Nach Mischprobe und Pchr identisch mit authentischem Material.

⁶⁰) Der N-Fleck konnte erst nach präparativer Anreicherung durch Chromatographie an SiO₂ entdeckt werden.

⁶¹) Auf die Isolierung des Hellebrigenins (= A) wurde verzichtet.

Mono-O-acetyl-Derivat von T. 19,5 mg T lieferten 22 mg rohes Acetat. Aus An-Ae 15 mg farblose unregelmässige Klötzchen, Smp. 246–263°, nach Umkristallisieren 266–272°, $[\alpha]_D^{26} = +20,4 \pm 3^\circ$ (c = 0,74 in Chf). Die Mischprobe mit authentischem Material schmolz gleich.

A = Hellebrigenin = Bufotalidin. Die 4,8 mg Kristalle (aus Gruppe 3) gaben aus An-Ae farblose Klötze, Smp. 150–155°. Nach Mischprobe, Pchr und IR.-Spektren (fest in Paraffinöl) identisch mit authentischem Material.

Subst. B1 = Jamaicobufagin. Dieser Stoff konnte mit keinem bekannten Bufogenin identifiziert werden. Aus An-Ae konnten langsam kleine farblose Körner erhalten werden, Smp. 164–173°. Das Umkristallisieren war sehr verlustreich. UV.-Spektren des amorphen Präparates vgl. Theoret. Teil, Farbreaktionen der Kristalle (Tab. 1 und 3) daselbst.

O-Acetyl-jamaicobufagin. 14,8 mg amorphes (nach Pchr einheitliches) B1 wurden mit 0,2 ml abs. Py und 0,15 ml (Ac)₂O 29 Std. auf 37° erwärmt. Die übliche Aufarbeitung gab 14,6 mg neutrales Rohprodukt. Aus An-Ae 6,7 mg farblose dünne Nadeln, Smp. 181–186°/210–218°. Nach Umkristallisieren aus An-Ae Smp. 162–178°, $[\alpha]_D^{25} = +52,7 \pm 4^\circ$ (c = 0,6 in Chf). UV.- und IR.-Spektrum vgl. Theoret. Teil. Laufstrecke im Pchr vgl. Fig. 8. 0,3 mg krist. Jamaicobufagin wurden ebenfalls acetyliert. Das Reaktionsprodukt war nach Pchr einheitlich und identisch mit dem krist. Acetylierungsprodukt des amorphen Präparates.

B2 = Hellebrigenol. Die 1,8 mg (aus Gruppe 5) erhaltenen Kristalle (farblose Körner) zeigten Smp. 145–154°. Nach Mischprobe (145–155°/249–251°) und Pchr identisch mit authentischem Material, insbesondere waren auch die mit SbCl₃ erhaltenen Färbungen gleich. Die IR.-Spektren (fest in KBr) waren bis auf ganz kleine Intensitätsunterschiede identisch.

Acetylierung von B2. 0,5 mg der obigen Kristalle wurden acetyliert. Das erhaltene Produkt zeigte im Pchr (Fig. 8) dieselbe Laufstrecke (Rf = 0,34) und dieselbe Färbung wie authentisches Di-O-acetyl-hellebrigenol.

C = Gamabufotalin. Dieser Stoff wurde aus dem Sekret von *Bufo marinus* nur in sehr kleiner Menge (4,6 mg aus Gruppe 5) in amorpher, aber papierchromatographisch einheitlicher Form erhalten. Das Präparat war nach Pchr (Chf/Fmd) und Färbung mit SbCl₃ mit authentischem Material identisch.

3-O-Acetyl-Derivat von C. 4,3 mg amorphes Präparat C wurden mit 0,1 ml abs. Py und 0,09 ml (Ac)₂O 24 Std. auf 37° erwärmt. Die übliche Aufarbeitung gab 3 mg neutrales Rohprodukt. Zweimaliges Kristallisieren aus An-Ae gab 0,5 mg farblose Platten, Smp. 215–237°. Nach Mischprobe und Pchr (Cyclohexan-Bc-(1:1)/Fmd, Front nicht abgetropft) identisch mit authentischem Di-O-acetyl-gamabufotalin. Auch die IR.-Spektren (in CH₂Cl₂) waren bis auf sehr geringe Intensitätsunterschiede gleich.

Subst. D. Das aus Fr. 42–50 von Tab. 16 erhaltene amorphe Präparat konnte bisher nur durch seine Laufstrecke im Pchr, seine Farbreaktionen und sein UV.-Spektrum (vgl. Theoret. Teil) charakterisiert werden. Eine Probe (0,5 mg) wurde mit Py und (Ac)₂O acetyliert. Das Rohprodukt zeigte im Pchr die in Fig. 8 wiedergegebene Laufstrecke.

b) Untersuchung der Probe b)

Extraktion der Bufogenine (ausgeführt Sept. 1957 von Herrn E. HAUSER). 75 g trockenes Sekret wurden wie bei RUCKSTUHL & MEYER¹⁵⁾ beschrieben fein gepulvert, gesiebt (Sieb Nr. VII der Pharmacopoea Helvetica V), mit Seesand vermischt und 8 Std. mit Chf-Me-(95:5) im Soxhlet extrahiert. Gab 15 g Material als gelben Schaum. Der Rückstand wurde im Mörser verrieben und nochmals 8 Std. mit Chf-Me-(8:2) extrahiert, wobei noch 1,5 g resultierten. Beide Teile zeigten im Pchr dieselben Flecke und wurden vereinigt (16,5 g).

Chromatographie an Al₂O₃ (ausgeführt von Herrn E. HAUSER). Die Hälfte (8,25 g) des obigen Materials wurde an 60 g Al₂O₃ chromatographiert (300 ml Lösungsmittel per Fraktion).

Die Fr. 1–20 (5,8 g, eluiert mit Bc-Chf-Gemischen von 3–70% Chf-Gehalt) gaben aus An-Ae 5 g Marinobufagin vom Smp. 210–225°. Die ML (0,8 g) wurden n. u.

Die Fr. 21–23 (0,60 g, eluiert mit Chf) gaben aus An-Ae 0,583 g Telocinobufagin vom Smp. 197–205°.

Die Fr. 24–31 (eluiert mit Chf sowie Chf-Me-Gemischen bis zu 5% Me-Gehalt) gaben Gemische. Lediglich aus Fr. 32 liessen sich aus An-Ae 20 mg Hellebrigenin in zu Drusen vereinigten Prismen vom Smp. 153°/227–232° isolieren.

Die weiteren mit Chf-Me-Gemischen und mit reinem Me eluierten Anteile (0,1 g amorphes Material) enthielten keine Bufogenine mehr; n. u.

Die zweite Hälfte des rohen Extraktes wurde genau gleich an Al_2O_3 chromatographiert. Insgesamt wurden erhalten: 10,021 g Marinobufagin, 1,652 g ML des Marinobufagins (n. u.), 1,116 g Telocinobufagin, 0,043 g Hellebrigenin und 0,750 g Mischfraktionen; Total 13,582 g.

Die 750 mg Mischfraktionen wurden erneut an 30 g Al_2O_3 chromatographisch in 43 Fraktionen aufgeteilt (100 ml Lösungsmittel pro Fraktion), worauf sich noch 240 mg Marinobufagin, 100 mg Telocinobufagin und 13 mg Hellebrigenin (aus Fr. 40) in Kristallen isolieren liessen. Die Fr. 33–39 wurden vereinigt (85 mg), ebenso die Fr. 41–43 (100 mg).

80 mg der vereinigten Fr. 33–39 wurden auf 8 Papierblättern (WHATMAN Nr. 1, 18×46 cm) im System Be-Chf-(6:4)/fmd getrennt. Laufdauer 24 Std. Dieses Material hatte im Pchr 4 Flecke gezeigt, entspr. T, A, U und B1. Die Zonen, die den drei letztgenannten entsprachen, wurden eluiert (T war bereits abgetropft).

Die A-Zonen lieferten 10 mg rohes Eluat. Nach Filtration durch Silicagel (in Chf) aus An-Ae 6 mg krist. Hellebrigenin in farblosen zu Drusen vereinigten Prismen, Smp. $147-160^\circ/220^\circ$.

Die U-Zonen lieferten 12 mg rohes Eluat, aus dem sich bisher keine Kristalle isolieren liessen.

Die B1-Zonen lieferten 14 mg rohes Eluat. Nach Reinigung an SiO_2 , aus An-Ae sehr langsam 8 mg krist. Jamaicobufagin in farblosen, feinen, zu Drusen vereinigten, Prismen Doppelsmp. 167 bis $169^\circ/210-220^\circ$ (Zers.).

Das Material der Fr. 41–43 (100 mg) gab im Pchr vor allem die Flecke A und B2, daneben noch schwach U und B1. 80 mg davon wurden wie oben auf 8 Papierblättern präparativ getrennt. Es wurden nur die B2-Zonen ausgeschnitten. Die Kontrolle mit einem schmalen Streifen dieser Zone zeigte, dass nur die untere Hälfte beim Entwickeln mit $SbCl_3$ eine Braunfärbung gab. Die Zone enthielt demnach noch eine andere Substanz. Insgesamt gaben die B2-Zonen 18 mg amorphes Eluat. Da es nicht kristallisiert werden konnte, wurde es mit 0,2 ml abs. Py und 0,2 ml $(Ac)_2O$ 15 Std. auf 35° erwärmt. Nach Eindampfen im Vakuum wurde an 0,45 g Al_2O_3 chromatographiert. Fr. 7 (eluiert mit Be-Chf-(1:1)) gab aus An-Pe 2 mg Di-O-acetyl-hellebrigenol in farblosen langen Prismen, Smp. $178-181^\circ$.

Beschreibung und Identifizierung der aus Probe b) isolierten Stoffe. – *Marinobufagin*, nach Mischprobe und Pchr mit authentischem Material identisch.

Telocinobufagin, nach Mischprobe und Pchr mit authentischem Material identisch.

Hellebrigenin. Die 56 mg Rohkristalle gaben aus An-Ae 36 mg farblose, zu Drusen vereinigte Prismen, Smp. $147-160^\circ/220-225^\circ$.

O-Acetyl-hellebrigenin. Die ML der obigen Kristalle wurden mit 0,3 ml $(Ac)_2O$ und 0,3 ml abs. Py 24 Std. auf 35° erwärmt. Die übliche Aufarbeitung und Kristallisation aus An-Ae gab wenig farblose Blättchen, Smp. $239-242^\circ$ (Zers.), nach Pchr einheitlich und identisch mit authentischem Material; auch die Mischprobe schmolz ohne Depression.

Jamaicobufagin. Die 8 mg rohe Kristalle gaben nach zweimaligem Kristallisieren aus An-Ae 2 mg zu Drusen vereinigte Prismen, Smp. $217-220^\circ$ (Zers.). Nach Pchr identisch mit dem Präparat aus Probe a).

Di-O-acetyl-hellebrigenol, nach Mischprobe und Pchr identisch mit authentischem Material.

Zusammenfassung

Die Isolierung von 12 Bufogeninen aus dem Sekret von *Bufo marinus* (L.) SCHNEIDER wird beschrieben. Davon sind 8 kristallisiert oder als krist. O-Acetyl-Derivat charakterisiert. Die 4 weiteren sind in amorpher, aber papierchromatographisch reiner Form gewonnen worden. 7 der kristallisierten und ein amorphes Genin konnten mit bekannten Bufogeninen identifiziert werden. Ein weiteres kristallisiertes (als Jamaicobufagin bezeichnetes) sowie 3 amorphe Genine (L, U und D) waren vermutlich neue Stoffe. Das nur in sehr kleiner Menge isolierte Argentinogenin könnte bei der wiederholten Chromatographie an Al_2O_3 aus Arenobufagin entstanden sein, das aber von uns in *Bufo marinus* nicht nachgewiesen wurde.

Organisch-chemische und Pharmazeutische Anstaltender Universität Basel