

44. Papierchromatographische Prüfung weiterer Krötensekrete¹⁾

Krötengifte, 25. Mitteilung²⁾

von M. Barbier, M. Bharucha, K. K. Chen, V. Deulofeu, E. Iseli, Herb. Jäger, M. Kotake, R. Rees, T. Reichstein, O. Schindler und Ek. Weiss

(16. XII. 60)

Vor einiger Zeit wurde über die papierchromatographische Prüfung einiger Krötensekrete auf ihren Gehalt an Bufogeninen berichtet³⁾⁴⁾. Die Resultate sind für Vergleichszwecke sowie als Basis für präparative Isolierungen nützlich. Wir haben inzwischen eine Reihe weiterer Sekrete und Hautproben erhalten können und sie, wie früher, orientierend geprüft. Gleichzeitig wurden auch noch zwei der alten Präparate in etwas besseren Systemen geprüft.

Beschaffung des Ausgangsmaterials (in Klammern ist die Verbreitung der Tiere angegeben)⁵⁾.

Bufo alvarius GIRARD (Colorado River und Imperial Valley, California). Davon stand nur das alte Präparat zur Verfügung, dessen Gewinnung früher erwähnt wurde⁴⁾.

B. alvarius besitzt Sekretdrüsen nicht nur hinter den Augen, sondern auch auf den Vorderbeinen.

Bufo blombergi MYERS & FUNKHOUSER, eine erst 1951 in SW-Columbien (Provinz Nariño, Umgebung von Nachao, NW von Pasto; weitere Verbreitung unbekannt) entdeckte Riesenkröte. 2,06 g Trockensekret. Beschaffung der Tiere und Gewinnung des Sekrets wurde früher beschrieben⁶⁾. Zwei Tiere hatten 2,156 g Trockensekret geliefert.

Bufo formosus BOULENGER (Japan, Umgebung von Tokio und Yokohama, nicht Formosa). Ausser der alten Probe Trockensekret⁴⁾ standen 209,1 g im Vakuum eingedampfter Hautextrakt zur Verfügung. Er stammte aus 500 japanischen Kröten, die der eine von uns (M.K.) im Frühjahr 1958 in der Umgebung von Tokio gefangen, und deren Häute er mit Äthanol extrahiert hatte. Über eine genaue Analyse dieses Materials wird später berichtet.

Bufo fowleri HINCKLEY, ein kleines, relativ seltenes Tier. (New England und New York, südlich bis Georgia, westlich bis Michigan und Missouri, kommt aber auch an den Küstenebenen des Atlantik und des Golfes von Mexico bis Zentral-Texas vor).

¹⁾ Teilweise Auszug aus den Diss. von Frl. M. BHARUCHA (1960) und Herrn E. ISELI, Basel; letztere erscheint später.

²⁾ 24. Mitteilung: PETER HOFER, HORST LINDE & KUHO MEYER, Helv. 43, 1955 (1960).

³⁾ J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, Helv. 40, 1270 (1957); R. BOLLIGER & K. MEYER, Helv. 40, 1659 (1957).

⁴⁾ H. SCHRÖTER, CH. TAMM, T. REICHSTEIN & V. DEULOFEU, Helv. 41, 140 (1958).

⁵⁾ Wir danken Herrn Dr. L. FORCART auch hier bestens für seine Angaben betr. Nomenklatur und Verbreitung der Tiere.

⁶⁾ F. G. HENDERSON, J. S. WELLES & K. K. CHEN, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 104, 176 (1960); Chem. Abstr. 55, 822 d (1961).

⁷⁾ K. K. CHEN, A. L. CHEN, J. Pharmacol. exper. Therap. 47, 281 (1933).

0,330 g Trockensekret hat der eine von uns (K.K.CH.) im Juni 1957 wie früher beschrieben⁷⁾ aus 32 Tieren gewonnen⁸⁾.

Bufo granulatus SPIX *subsp. fernandeze* GALLARDO. Wir erhielten im Dezember 1958 3 trockene Häute der *Subspecies* von Herrn Dr. JOSÉ M. GALLARDO, einem Experten auf dem Gebiet. Er hat die Tiere im Aug.-Sept. 1958 in der Umgebung der Stadt Buenos Aires gefangen und selbst bestimmt. Nach seinen Angaben findet sich die Species im ganzen ost-nord-östlichen Teil des südamerikanischen Kontinents von Panama bis zum südlichen Teil der Provinz Buenos Aires in Argentinien. Es können drei *Subspecies* unterschieden werden. Die *subspecies fernandeze* findet sich im ganzen Becken des Rio de la Plata. Die 3 Häute (Totalgewicht 3 g) lieferten 320 mg rohen Methanolextrakt.

Bufo peltoccephalus TSCHUDI (Cuba). 0,158 g Trockensekret, dessen Gewinnung früher⁶⁾ beschrieben wurde. Zwei Tiere hatten 0,237 g Trockensekret ergeben.

Bufo spinulosus WIEGMANN (= *B. chilensis* TSCHUDI) (Chile und Peru). Die alte Probe (1 g Trockensekret)⁴⁾ stammte ca. aus dem Jahre 1939. Ein frisches Präparat (0,102 g Trockensekret) sowie drei trockene Häute (total ca. 6 g) erhielt der eine von uns (V.D.) im Mai 1958 von Herrn Prof. LUIS CAPURRO in Santiago de Chile. 2,237 g Haut lieferten 212 mg rohen Methanolextrakt.

Bufo valliceps WIEGMANN (Louisiana, New Mexico, Texas bis Costa Rica). Ausser der alten Probe (1,49 g) Trockensekret aus dem Jahre 1931⁴⁾ hat der eine von uns (K.K.CH.) im Juni 1957 nach früherer Methode⁷⁾ 2,225 g Trockensekret aus 163 Tieren⁸⁾ gewinnen können.

Ferner wurden am 4. Juni 1931 noch 14,654 g getrocknete Haut (nur die Teile über den Drüsen sowie vom Rücken) gewonnen. Aus 483 mg Hautpulver wurden 22 mg roher Methanolextrakt erhalten.

Ausführung der Papierchromatographie. – Die Extraktion der Proben geschah genau wie früher beschrieben⁴⁾. Zum Nachweis der Bufogenine im Papierchromatogramm diente die Photokopie unter Verwendung eines Monochromators⁹⁾ sowie durch Färbung mit SbCl_3 ¹⁰⁾. Letztere ergibt teilweise eine zusätzliche Differenzierung. Von jedem Extrakt wurden mindestens 4 Papierchromatogramme unter 4 verschiedenen Bedingungen gemacht. Die jeweils passenden Systeme sind aus den Figuren 1-9 ersichtlich. Buchstabenbezeichnung vgl. Tab. 1.

Besprechung der Resultate. – Soweit gleiches Material wie früher geprüft wurde, stimmen die Resultate befriedigend überein. Grössere Unterschiede ergaben sich zwischen frischen und sehr alten Proben.

⁸⁾ Die Tiere stammten aus New Orleans, Louisiana, und wurden von der Southern Biological Supply Co., New Orleans, bezogen. Sie wurden vom verstorbenen Dr. KARL P. SCHMIDT, Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois (einem anerkannten Herpetologen) identifiziert.

⁹⁾ Vgl. spätere Beschreibung. Bei Einstellung auf ein Intensitätsmaximum bei 302 $m\mu$ und Verwendung einer Hg-Hochdrucklampe wurde dabei fast ausschliesslich das Licht erfasst, das den Linien bei 296,8 und 302,1 $m\mu$ entstammt. Empfindlichkeit ca. 0,003 mg Bufogenin.

¹⁰⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 34, 2278 (1951); vgl. auch D. LAWDAY, *Nature* 170, 415 (1952).

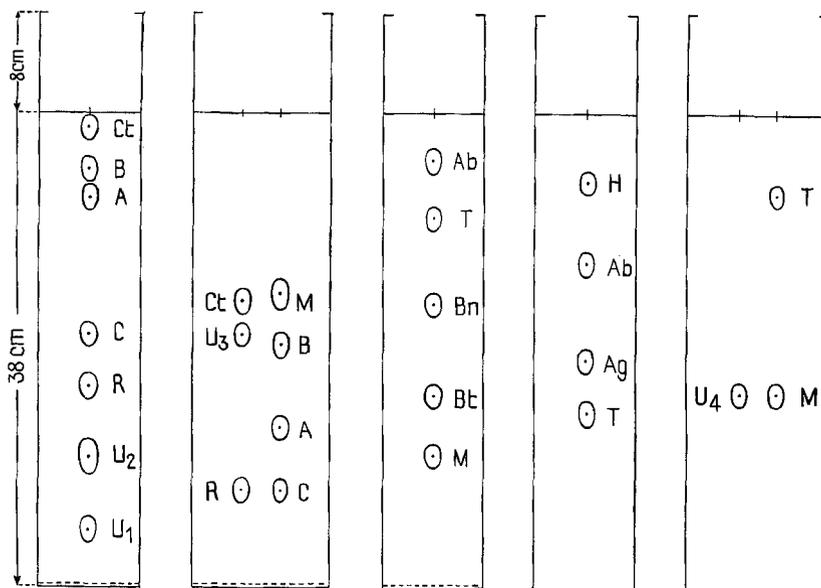


Fig. 1
Be-Cy-(1:1)/
Fmd 3 Std.

Fig. 2
Be/Fmd
3 Std.

Fig. 3
Be-Chf-(7:5)/
Fmd $2\frac{1}{2}$ Std.

Fig. 4
Be-Chf-(7:5)/
Fmd $6\frac{1}{2}$ Std.

Fig. 5
Be-Chf-(1:1)/
Pgl-W-(4:1)
7 Std.

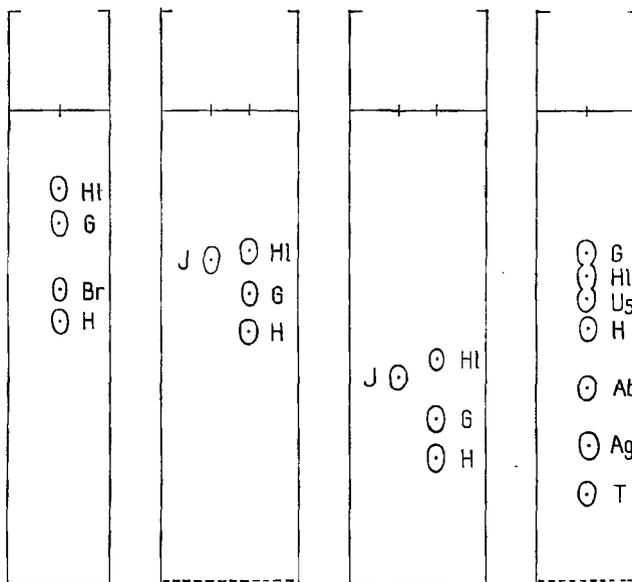


Fig. 6
Be-Chf-(1:1)/
Pgl-W-(4:1)
16 Std.

Fig. 7
Be-Thf-(1:1)/
Fmd
 $2\frac{3}{4}$ Std.

Fig. 8
Be-Thf-(1:1)/
Fmd
6 Std.

Fig. 9
Chf/Fmd
 $2\frac{1}{2}$ Std.

Tabelle 1. Übersicht der in 8 Krötenarten papierchromatographisch nachgewiesenen Bufogenine nach abnehmender Laufstrecke geordnet¹¹⁾

| Buchstaben Bezeichnung | Untersuchte Species. Wo nichts angegeben, wurde Trockensekret verwendet. (In Klammern Initialen des Teil- nehmers dieser Arbeit, der die Analyse durchführte.) | <i>B. alvarius</i> (M. Bh.) | <i>B. blombergi</i> (E. I.) | <i>B. formosus</i> (M. Bh.) (alt) | <i>B. formosus</i> (M. Bh.) (neu) Hautex- trakt u. E. I.) | <i>B. fowleri</i> (R. R.) | <i>B. granulatus</i> (M. Bh.) Hautextrakt | <i>B. peltocephalus</i> (E. I.) | <i>B. spinitulosus</i> (M. Ba.) (neu) | <i>B. spinitulosus</i> (M. Ba.) | Hautextrakt <i>B. valliceps</i> (R. R. u. (neu) M. Bh.) | <i>B. valliceps</i> (E. I.) Hautextrakt | Färbung mit SbCl ₃ bei Tageslicht (beim Erhitzen) |
|---------------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|---|--|------------------------------|---|------------------------------------|---|------------------------------------|--|---|---|
| | Ausbeute an rohem Extrakt aus 30 mg Trockensekret bzw. aus 30 mg rohem Me-Extrakt von Haut | 0,5 | 11,3 | 0,5 | 7,5 | 5 | 6 | 5,7 | 8,8 | 13 | 5 | 12,3 | |
| U1 | Unbekannter Fleck ¹²⁾ | | | | + | | + | | | + | | + | gelb braun violett |
| U2 | Unbekannter Fleck | | | | (+) | | | | | | | | gelb grün blau |
| R | Resibufogenin | | | | | | | | | | | | grau violett hellgelb |
| C | Cinobufagin | | | | (+) | + | | | | | | | farblos-blassgelb |
| A | Artebufogenin | | | | | | | | | | | | blaugrau |
| B | Bufalin | | | | | + | | + | | | | | blass braun violett |
| U3 | Unbekannter Fleck | | | | | | | | | | | | blau violett |
| Ct | Cinobufotalin | | | | | | | | | | | | braun violett |
| M | Marinobufagin | | | | | | | | | | | | orange |
| U4 | Unbekannter Fleck | (+) | | | + | | | | | | | | gelb-graublau |
| Bt | Bufotalin | | | | | | | | | | | | orange-grün |
| Bn | Bufotalinin | | | | | | | | | | | | blauviolett |
| T | Telocinobufagin | | | | | + | | + | | | | | farblos-hellgelb |
| Ag | Argentinoagenin | | | | | | | | | | | | farblos |
| Ab | Arenobufagin | | | | + | | | | | | | | orange-grün |
| H | Hellebrigenin = Bufotalidin | | | | | | | | | | | | farblos |
| Br | Butarenogin | (+) | | | | | | | | | | | graublau |
| G | Gamaobufotalin | | | | | | | | | | | | gelb (kalt) – violett blau |
| J | Jamaicobufagin | | | | + | | | | | | | | grau blau |
| U5 | Unbekannter Fleck | | | | | | | | | | | | braun gelb |
| HI | Hellebrigenol | | | | | | | | | | | | |
| | Zahl der langsamen Flecke | 2 ¹³⁾ | 1 ¹⁴⁾ | | 3 ¹⁵⁾ | 1 | 3 ¹⁵⁾ | 1 ¹⁶⁾ | | | | | + |
| | | | | | | | | | | | | | 2 ¹⁷⁾ |

¹¹⁾ (+) = sehr schwach; + + + = sehr starke Flecke. Die Reihenfolge für G und HI kehrt sich im System von Fig. 9 um.

¹²⁾ Sehr rasch laufender Fleck, vermutlich identisch bei *B. formosus* und *B. granulatus*; möglicherweise von Sterinen herrührend.

¹³⁾ Beide mit SbCl₃ gelbbraun, davon einer im System Chf/Fmd stationär. ¹⁴⁾ Mit SbCl₃ schmutzig gelb (stationär).

¹⁵⁾ Mit SbCl₃ gelbbraun (stationär), violett und gelb. ¹⁶⁾ Mit SbCl₃ rotblau. ¹⁷⁾ Mit SbCl₃ gelb, bzw. blau.

Bufo alvarius. Diese sehr alte Probe gab auch diesmal keine eindeutigen Resultate. Als einziges bekanntes Genin konnten (im System Nr. 6) Spuren von Hellebrigenin nachgewiesen werden. Im System Nr. 4 zeigte sich neben einem stationären Fleck ein schwacher Fleck mit gleicher Laufstrecke wie Marinobufagin, aber Färbung mit SbCl_3 orange statt graublau. Der stationäre Fleck liess sich im System Nr. 6 in 2 Flecke auflösen, von denen einer auch dabei stationär war. Ferner wurde im System Nr. 4 ein langgezogener Fleck (von Startlinie bis Bufotalinin) erhalten, der sich mit SbCl_3 stark blau färbte, aber in der Photokopie nicht sichtbar war. Zur Entscheidung der Frage, was für Bufadienolide *Bufo alvarius* produziert, wäre frisches Sekret nötig.

Bufo blombergi. Da mit dem nach allgemeiner Vorschrift bereiteten Extrakt bei der Papierchromatographie keine Flecke erhalten wurden, haben wir das verbliebene Material (9 mg) zwischen 80-proz. Methanol und Petroläther verteilt. Letzterer entfernte dabei aber nur 2,3 mg petrolätherlösliche Stoffe. Die 5,8 mg methanollösliche Anteile gaben im Papierchromatogramm (2 mg aufgetragen) auch keine sichtbaren Flecke. *B. blombergi* scheint somit keine merklichen Mengen an Bufadienoliden zu produzieren. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit den biologischen Befunden⁶⁾ sowie mit einer chemischen Untersuchung von PETER HOFER und KUNO MEYER¹⁸⁾.

Bufo formosus. Das frische Material gab erheblich mehr Flecke als die alte Probe⁴⁾. Da es sich um Hautextrakt gehandelt hat, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Es ist aber wahrscheinlich, dass frisches Sekret von *B. formosus* mindestens ebenso viele Genine liefert wie der Hautextrakt.

Bufo spinulosus. Von den früher⁴⁾ in einem alten Präparat papierchromatographisch identifizierten Bufadienoliden konnten fünf im neuen Präparat wieder sehr deutlich nachgewiesen werden. Lediglich der früher andeutungsweise beobachtete Fleck des Bufotalinins wurde nicht gefunden. Auch die früher festgestellten vier unbekannt schwachen Flecke wurden nicht gefunden. Möglicherweise hat es sich um Zersetzungsprodukte gehandelt. Im Hautextrakt wurden nur drei Bufadienolide festgestellt.

Bufo valliceps. Das frühere Präparat⁴⁾ hatte trotz seinem Alter noch drei deutliche Flecke gegeben (entspr. Hellebrigenol, Telocinobufagin und Marinobufagin). Das frische Präparat gab jetzt ausser denselben drei Flecken noch drei weitere (entspr. einem unbekannt sowie Hellebrigenin und Arenobufagin). Im Hautextrakt wurden von diesen nur vier gefunden, dafür ein weiterer unbekannter, sehr rasch laufender Fleck.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Die Extraktion der Trockensekrete mit Wasser-Methanol-Chloroform wurde genau wie früher ausgeführt, aber meist unter Verwendung von 30 mg Trockensekret. Trockene Haut wurde zuerst zerkleinert und mit Methanol 12 Std. bei 20° stehengelassen; diese Extraktion wurde nach Verreiben im Mörser noch 5mal wiederholt. Die Ausbeuten an rohen Extrakten sind in Tab. 2 angegeben.

¹⁸⁾ Privatmitteilung von Herrn Prof. K. MEYER, für die auch hier bestens gedankt sei.

Tabelle 2. *Ausbeuten an rohem Methanolextrakt aus Hautpulvern*

| | Menge trockene Haut | Menge roher Me-Extrakt |
|----------------------------------|------------------------|---------------------------|
| <i>Bufo granulatus</i> | 3,0 g | 320 mg entspr. 10,6% |
| <i>Bufo spinulosus</i> | 2,237 g | 212 mg entspr. 9,5% |
| <i>Bufo valliceps</i> | 0,483 g | 22 mg entspr. 4,6% |

Der rohe Methanolextrakt wurde wie Trockensekret weiterbehandelt und gab die in Tab. 1 angegebene Menge Material.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung von sieben Trockensekreten und vier Hautextrakten aus insgesamt 8 Krötenarten mit Hilfe der Papierchromatographie wird beschrieben.

The Lilly Research Laboratories,
Indianapolis 6, Indiana, USA (K. K. CH)
Laboratorio de Quimica,
Facultad de Ciencias Exactes y Naturales,
Buenos Aires (V. D.)
Higashiyama-cho 132, Ashiya-shi,
Hyogo-Pref., Japan (M. K.) und
Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

45. Über Pyromellitsäure- und Cumidinsäure-Derivate

III. Teil¹⁾

von H. Hopff, A. Maggi und B. K. Manukian

(16. XII. 60)

Über die Nitroderivate der Pyromellit- und Cumidinsäure ist sehr wenig bekannt²⁾³⁾. Da wir vor einiger Zeit Chlorderivate der oben erwähnten Säuren herstellten⁴⁾, entschlossen wir uns, auch einige Nitroderivate der Pyromellit- und Cumidinsäure herzustellen. Nach den Veröffentlichungen über Oxydationen⁴⁾⁵⁾ scheint die Herstellung von Nitropolycarbonsäuren durch Behandlung der Nitrochlormethyl-Verbindungen mit Salpetersäure am aussichtsreichsten zu sein.

Die Aufgabe bestand vorerst in der Herstellung der noch unbekanntenen Mono- und Dinitro-bis-chlormethyl-Verbindungen sowie einiger Derivate davon, sodann in

¹⁾ II. Teil, Helv. 43, 1645 (1960).

²⁾ H. DE DIESBACH & L. CHARDONNES, Helv. 7, 614 (1924).

³⁾ E. PHILIPPI, Liebigs Ann. Chem. 428, 308 (1922); J. U. NEF, Liebigs Ann. Chem. 237, 5, 7, 8, 20 (1887).

⁴⁾ H. HOPFF & B. K. MANUKIAN, Helv. 43, 941 (1960).

⁵⁾ H. HOPFF & K. WEBER, Chimia 10, 95 (1956); K. WEBER, Diss. ETH, Zürich, Nr. 2573 (1956); I. S. BENGELSDORF, J. org. Chemistry 23, 242 (1958); E. B. BENGTSOON, Acta chem. scand. 7, 774 (1953); A. BENNING, Angew. Chem. 72, 574 (1960); C. HÄUSSERMANN & E. MARTZ, Ber. deutsch. chem. Ges. 26, 2982 (1893).