

## 74. Die Bufogenine des Paratoidensekretes von *Bufo regularis* REUSS<sup>1)</sup>

Über Krötengifte, 26. Mitteilung<sup>2)</sup>

von M. Bharucha, Herb. Jäger, Ek. Weiss und T. Reichstein

(18. II. 61)

Bufotalinin ist ein seltenes Steroid, das nach WIELAND & HESSE<sup>3)</sup> zuerst von H. MEYER isoliert und von WIELAND, HESSE & HÜTTEL<sup>4)</sup> genauer beschrieben wurde. Obwohl es im Sekret der europäischen Erdkröte *Bufo bufo bufo* L. nur zu ca. 1% enthalten ist<sup>5)</sup>, konnte seine Struktur weitgehend abgeklärt werden<sup>6)</sup>. Zur Sicherstellung derselben und zur Herstellung von Derivaten war weiteres Material erwünscht. SCHRÖTER *et al.*<sup>7)</sup> haben die Sekrete von 9 Krötenarten untersucht. Sie fanden, dass *Bufo regularis* REUSS am meisten davon produziert. Wir beschreiben hier die präparative Trennung von solchem Material. In erster Linie wurde dabei die Gewinnung des Bufotalinins angestrebt; die anderen Produkte wurden papierchromatographisch nachgewiesen und nur isoliert, soweit dies ohne zu grossen Zeitaufwand möglich war.

*Ausgangsmaterial.* Es standen die folgenden Präparate zur Verfügung:

- a) 5 g Trockensekret aus *Erythrea*, wie früher beschrieben<sup>7)</sup>.
- b) 0,8 g Trockensekret von 28 Tieren aus SW-Afrika, wie früher beschrieben<sup>7)</sup>.
- c) 1,349 g Trockensekret (noch etwas Hautbestandteile enthaltend) von 41 Tieren aus SW-Afrika. Dazu erhielten wir die mit Watte abgetupften Sekretreste. Die Extraktion dieser Watte mit Chloroform-Methanol-(1:1) lieferte noch 0,219 g Extrakt, die mit dem obigen Trockensekret vereinigt wurden (Total 1,568 g<sup>8)</sup>).

Die Proben b) und c) stammen sicher von *B. regularis*, da Herr F. GAERDES die Species genau kennt.

Die Provenienz der Probe a) ist dagegen, wie früher erwähnt, unsicher<sup>7)</sup>, da kein ganzes Tier als Beleg für die Bestimmung zu erhalten war. Für die Annahme, dass das Material von *B. regularis* stammt, sprach die Tatsache, dass in *Erythrea* *B. regularis* häufig sein soll. Ausserdem kommt (seltener) auch *B. mauretanicus* vor. Ferner konnten SCHRÖTER *et al.*<sup>7)</sup> in den Proben a) und b) in Papierchromatogrammen 6 genau gleiche Genine nachweisen (vgl. Tab. 3). Mit weiteren Systemen, die eine bessere

<sup>1)</sup> Auszug aus Diss. Frl. M. BHARUCHA, Basel 1960.

<sup>2)</sup> 25. Mitt.: M. BARBIER, M. BHARUCHA, K. K. CHEN, V. DEULOFEU, E. ISELI, HERB. JÄGER, M. KOTAKE, R. REES, T. REICHSTEIN, O. SCHINDLER & EK. WEISS, *Helv.* 44, 362 (1961).

<sup>3)</sup> H. WIELAND & G. HESSE, *Liebigs Ann. Chem.* 577, 22 (1935).

<sup>4)</sup> H. WIELAND, G. HESSE & R. HÜTTEL, *Liebigs Ann. Chem.* 524, 203 (1936).

<sup>5)</sup> H. R. URSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 38, 883 (1955).

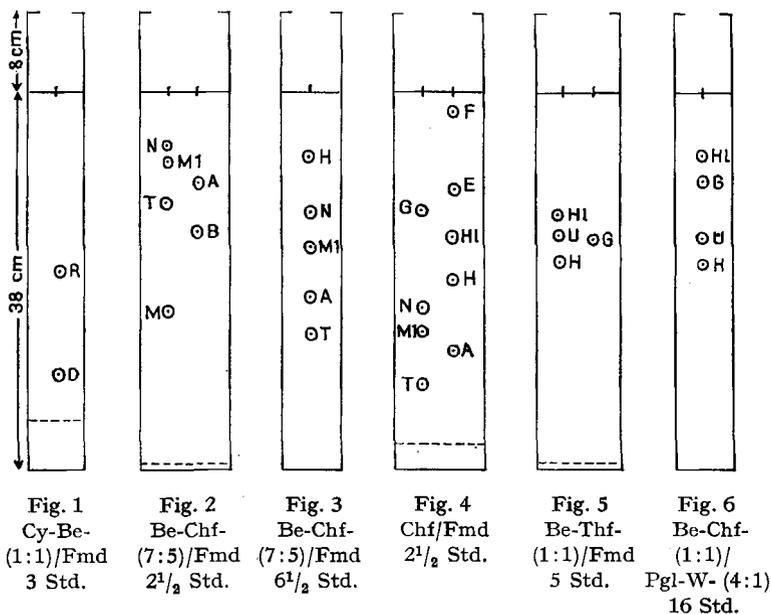
<sup>6)</sup> H. SCHRÖTER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 47, 720 (1958).

<sup>7)</sup> H. SCHRÖTER, CH. TAMM, T. REICHSTEIN & V. DEULOFEU, *Helv.* 47, 140 (1958).

<sup>8)</sup> Das Material wurde wiederum von Herrn F. GAERDES, Okahandja, Südwestafrika, zwischen November 1957 und Januar 1958 (Briefe vom 7. und 27. 12. 57 und 18. 1. 58) gesammelt, dem wir für seine Mühe auch hier bestens danken möchten. Es erreichte uns in ausgezeichnetem Zustand und wurde nach Eintreffen im Vakuum eingeschmolzen und bis zur Verarbeitung im Dunkeln aufbewahrt.

Differenzierung ermöglichten (vgl. Fig. 1–6), erhielten wir allerdings zwischen den Proben a) und b) deutliche Unterschiede.

Für die folgende Untersuchung wurde daher Probe a) für sich getrennt und die Proben b) und c) vereinigt. Zur papierchromatographischen Kontrolle dienten die 6 in den Fig. 1–6 angegebenen Systeme.



Die Fig. 1–6 stellen schematisierte, aber massgetreue Beispiele der Papierchromatogramme dar<sup>9)</sup>. Ausführung absteigend nach früheren Angaben<sup>10–12)</sup> 5). Wo keine Front (gestrichelt) eingezeichnet ist, wurde sie abtropfen gelassen. Bedeutung der Buchstabenbezeichnungen vgl. Tab. 1. Bei den Systemen ist zuerst das Fließmittel<sup>9)</sup> angegeben und nach dem schrägen Strich die ruhende Phase. Bei krist. Stoffen wurden jeweils 0,05 mg aufgetragen, bei amorphen Gemische je ca. 0,1–0,2 mg. Zur Sichtbarmachung der Flecke diente die direkte Photokopie im gefilterten UV.-Licht<sup>13)</sup> oder besser mit Monochromator<sup>14)</sup> und anschliessendes Spritzen mit SbCl<sub>3</sub> in Chf<sup>15)</sup> 16). Die besonders beim Erhitzen entstehenden Färbungen (vgl. Tab. 1) dienen als zusätzliche Charakterisierung.

<sup>9)</sup> Abkürzungen für Lösungsmittel usw., vgl. Einleitung zum Exper. Teil.

<sup>10)</sup> O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 108 (1951).

<sup>11)</sup> R. BOLLIGER & K. MEYER, *Helv.* 40, 1659 (1957).

<sup>12)</sup> H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 36, 357 (1953).

<sup>13)</sup> R. BERNASCONI, H. P. SIGG & T. REICHSTEIN, *Helv.* 38, 1767 (1955).

<sup>14)</sup> Der Apparat soll demnächst beschrieben werden. Als Lichtquelle diente eine Quecksilber-Hochdruck-Lampe. Bei Einstellung des Monochromators auf ein Intensitätsmaximum von 302 m $\mu$  wurde fast ausschliesslich das Licht der Linien bei 296,8 und 302,1 m $\mu$  erfasst. 0,003 mg Bufogenin gaben nach Chromatographie auf Papier bei der Photokopie noch einen deutlichen Fleck.

<sup>15)</sup> R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 34, 2278 (1951); D. LAWDAY, *Nature* 170, 415 (1952).

<sup>16)</sup> Das Papier wird vorher durch halbstündiges Erhitzen auf 90° im Trockenschrank möglichst vom Fmd oder Pgl befreit.

Tabelle 1. Färbungen mit  $SbCl_3$ <sup>18)</sup>

Buchstabenbezeichnung und event. Identifizierung	Färbung mit $SbCl_3$ nach Erhitzen (Tageslicht)
F = Subst. F, nicht identif.	gelb-braun
E = Subst. E, „ „	rot-violett
U = Bufarenogin <sup>17)</sup> 18)	farblos
G = Gamabufotalin <sup>19)</sup> 18)	blau-grau
HI = Hellebrigenol <sup>20)</sup>	grün-gelb
H = Hellebrigenin <sup>21)</sup> = Bufotalidin <sup>3-5)</sup>	orange-grün, bei starkem Erhitzen grau-violett
N = Arenobufagin <sup>22)</sup>	farblos
M1 = Subst. M1, nicht identif.	farblos
A = Argentinogin <sup>17)</sup>	farblos-grau
T = Telocinobufagin <sup>23)</sup>	blau-violett
B = Bufotalinin <sup>6)</sup>	orange-gelb-grün
M = Marinobufagin <sup>24)</sup>	grau-blau
R = Resibufogin <sup>25)</sup>	blau-violett
D = Subst. D, nicht identif., vermutl. Sterine	violett

*Vortrennung.* Für die Vortrennung der Sekrete diente eine grobe Verteilungschromatographie<sup>5)</sup>; sie lieferte die in Tab. 2 genannten Ausbeuten.

Tabelle 2. Vortrennung der Sekrete durch grobe Verteilungschromatographie

Art der Eluate	Präp. a 4,891 g	Präp. b+c 2,143 g
Chf-Eluate . . . . .	941 mg	213 mg
Chf-Bu-(9:1) bis -(4:1) . . . . .	61 „	273 „ nicht untersucht
Me . . . . .	345 „	300 „ „ „

Bisher wurden nur die Chf-Eluate untersucht, da sie praktisch alle hier interessierenden Bufogenine enthielten.

*Untersuchung des Materials aus Präp. a.* Dieses zeigte teilweise erst nach präparativer Anreicherung im Pch (vgl. Fig. 1–6 und Tab. 3) 8 Flecke, die mit den Buchstaben D, R, M, B, H, HI, E, und F bezeichnet werden (Reihenfolge zunehmender Polarität). Bei D handelt es sich vermutlich um ein Gemisch von Sterinen. Die schwachen Flecke E und F konnten nicht identifiziert werden. Die Identifizierung

<sup>17)</sup> R. REES, O. SCHINDLER, V. DEULOFEU & T. REICHSTEIN, *Helv.* 42, 2400 (1959).

<sup>18)</sup> Diente zum Vergleich, wurde in *B. regularis* nicht gefunden.

<sup>19)</sup> K. MEYER, *Helv.* 32, 1599 (1949).

<sup>20)</sup> A. KATZ, *Helv.* 40, 831 (1957); Acetylderivat: J. SCHMUTZ<sup>21)</sup>.

<sup>21)</sup> J. SCHMUTZ, *Helv.* 32, 1442 (1949).

<sup>22)</sup> P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Tetrahedron Letters* Nr. 7, 8 (1959); *Helv.* 43, 1950 (1960).

<sup>23)</sup> K. MEYER, *Helv.* 32, 1593 (1949).

<sup>24)</sup> H. SCHRÖTER, R. REES & K. MEYER, *Helv.* 42, 1385 (1959); vgl. auch W. E. THIESSEN, *Chemistry & Ind.* 1958, 440.

<sup>25)</sup> H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* 42, 807 (1959).

der anderen ist aus den Tab. 1 und 3 ersichtlich. Durch Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  liessen sich R, B und H in Kristallen isolieren und mit authentischem Material identifizieren. Ausbeute: R = 48 mg (1,0%), B = 51 mg (1,0%) und H = 168 mg (3,5%). Eine Trennung der verbleibenden Gemische erfolgte nicht.

*Untersuchung des Materials aus den Präparaten b + c.* Hier waren papierchromatographisch (teilweise nach präp. Vortrennung) neun Genine nachweisbar, D, R, B, T, N, M1, A, H und Hl. Nach Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  wurden B und H in Kristallen isoliert. Ausbeute: B = 10 mg (0,5%) und H = 11 mg (0,5%). In den verbleibenden Gemischen waren T, A, M1 und N nur in sehr kleinen Mengen anwesend. Eine Trennung erfolgte nicht. Wie sich aus den Angaben im Exper. Teil ergibt, ist auch hier H das Hauptgenin, nur waren die Ausbeuten bei diesen Präparaten merklich geringer als bei Präp. a.

Tab. 3 gibt einen Vergleich der früher und jetzt in den verschiedenen Präparaten papierchromatographisch nachgewiesenen, bzw. präp. isolierten Genine.

Tabelle 3. Die im Sekret von *Bufo regularis* nachgewiesenen Genine<sup>26)</sup>

Buchstabenbezeichnung und event. Identifizierung	SCHRÖTER <i>et al.</i> <sup>7)</sup> in Probe		Jetzt gefunden in Probe	
	a	b	a	b + c
F = Subst. F, nicht identif. . . . .			(+)	
E = Subst. E, „ „ „ „			(+)	
Hl = Hellebrigenol . . . . .	+	+	+	+
H = Hellebrigenin = Bufotalidin . . . . .	++	++	+++	+++
N = Arenobufagin . . . . .	(+)	++		(+)
M1 = Subst. M1, nicht identif. . . . .				(+)
A = Argentinogenin . . . . .				(+)
T = Telocinobufagin . . . . .				(+)
B = Bufotalinin . . . . .	+++	+++	++	++
M = Marinobufagin . . . . .	+	+	+	
R = Resibufogenin . . . . .	++	++	++	+
D = event. Sterine (?) . . . . .			+	+

*Diskussion der Resultate.* Die neuen papierchromatographischen Resultate stimmen bei Probe a weitgehend mit den früheren Befunden überein. Kleine Unterschiede sind verständlich, wenn man berücksichtigt, dass jetzt präparativ weitgehend angereicherte Proben untersucht wurden, die viel deutlichere Ergebnisse liefern. Eine gewisse Verschiebung ergibt sich in der Beurteilung der Menge. Hauptgenin ist H (Hellebrigenin), nicht B (Bufotalinin), wie früher vermutet; dieses folgt erst an zweiter Stelle. Das früher in Spuren nachgewiesene Arenobufagin konnte jetzt gar nicht aufgefunden werden. Etwas grössere Unterschiede ergaben sich bei den Präparaten b + c. Insbesondere fanden wir hier gar kein Marinobufagin mehr und nur Spuren von Arenobufagin. Letzteres wird aber beim Kontakt mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  teilweise verändert<sup>17)</sup>, so dass event. ein merklicher Teil verloren ging. Das Auffinden sehr kleiner Mengen der Stoffe T, A und M1 dürfte auf die präparative Anreicherung zurückzuführen sein.

<sup>26)</sup> In Klammern sehr schwache Flecke, die entsprechenden Stoffe kommen nur in Spuren vor.

Die Präparate aus SW-Afrika zeigten aber doch merkliche Unterschiede gegenüber denjenigen aus Erythrea. Auch hier war aber Hellebrigenin das Hauptgenin, gefolgt von Bufotalinin, was sich auch durch präparative Isolierung bestätigte. Der Gehalt an beiden war aber merklich geringer als bei Probe a. Dies ist nur teilweise damit erklärbar, dass die Proben b + c etwas weniger stark eingetrocknet waren und daher noch etwas mehr Wasser enthielten als a. Wie eingangs erwähnt, war es nicht möglich, sicher zu entscheiden, ob es sich bei den Tieren aus Erythrea wirklich um *Bufo regularis* gehandelt hat. Lokale Unterschiede in der gefundenen Grössenordnung wären aber durchaus möglich.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze in hier benützter Ausführungsform bis 200° ca.  $\pm 2^\circ$ , darüber ca.  $\pm 3^\circ$ . Substanzproben zur Drehung wurden 1 Std. bei 70° und 0,05 Torr getrocknet. Die Adsorptionschromatogramme wurden nach der Durchlaufmethode<sup>27)</sup> an alkalifreiem  $\text{Al}_2\text{O}_3$ <sup>28)</sup> oder  $\text{SiO}_2$ <sup>29)</sup> durchgeführt. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chf (oder Chf-Ae-(1:3)), Waschen mit 2N HCl, W, 2N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und W, Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Eindampfen im Vakuum.

Es werden folgende Abkürzungen benützt: Ac =  $\text{CH}_3\text{CO}$ , Ae = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Be = Benzol, Bu = n-Butanol, Chf = Chloroform, Cy = Cyclohexan, Fr = Fraktion(en), «Gemisch» = Chf-Me-Äthylacetat-(1:1:1), Me = Methanol, ML = eingedampfte Mutterlauge, n. u. = nicht untersucht, Pch = Papierchromatographie und Papierchromatogramm(e), Pe = Petroläther, Pgl = Propylenglykol, Py = Pyridin, Thf = Tetrahydrofuran, W = Wasser.

### Untersuchung von Probe a

Vortrennung durch grobe Verteilungschromatographie<sup>5)</sup>. 4,891 g Trockensekret wurden mit 20 ml W 2 Std. auf der Maschine geschüttelt. Die trübe Lösung wurde mit 20 g gereinigtem Kieselgur (Hyflo Super Cel)<sup>12)</sup> vermischt und mit Chf auf die mit Chf bereitete Säule Nr. 1<sup>12)</sup> gebracht, die mit 200 g Kieselgur-Wasser-(1:1) (Gewichtsteile) beschickt war. Anschliessend wurde mit Chf und Chf-Bu-Gemischen (jeweils 90% mit W gesättigt) chromatographiert. Laufgeschwindigkeit ca. 50 ml pro Std. Zum Schluss wurde die Säule mit Me erschöpfend ausgewaschen. Resultat, vgl. Tab. 4.

Tabelle 4. Grobe Verteilungschromatographie von 4,891 g Trockensekret (Probe a)

Fraktionen Nr.	Eluiermittel		Eindampfrückstand, roh	
	Art	Menge total in ml	Menge in mg	Weitere Verarbeitung und Aussehen
1–12	Chf	600	941	Chromat. an $\text{Al}_2\text{O}_3$
13–19	Chf-Bu-(9:1)	475	49	n. u. (braun amorph)
20	„ „-(8:2)	300	12	„ „ „ „
21	Me	erschöpfend extrahiert	354	„ „ „ „

Die Fr 1–12 von Tab. 4 (941 mg) wurden an 30 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert. Über das Ergebnis orientiert Tab. 5, aus der sich auch die vorhandenen Mengen gut schätzen lassen.

<sup>27)</sup> T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Discuss. Faraday Soc. 7, 305 (1949).

<sup>28)</sup> «MERCK», standardisiert nach BROCKMANN.

<sup>29)</sup> Silicagel, engporig 0,15–0,3 mm gekörnt «für Chromatographie», bezogen von Dr. BENDER & Dr. HOBEIN AG., Zürich.

Tabelle 5. *Chromatographie von 941 mg Chf-Eluat an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*

Fraktions Nr.	Eluiermittel je 100 ml pro Fr	Eindampfrückstand					
		roh		Kristalle			
		Menge in mg	Flecke im Pch	aus	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pch
1-9	Pe-Be-(3:7) bis Be	17					
10-21	Be-Chf-(95:5) bis (85:15)	19	D				
22-27	„ „ -(7:3)	56	R	An-W	48	99-103°	R
28-30	„ „ -(1:1)	17	R				
31-35	„ „ „	9	M				
36-39	„ „ -(1:3)	18	M				
40-42	Chf	12	M				
43-44	Chf-Me-(99,5:0,5)	77	B	An-Ae	51	173-190°	B
45	„ „ „	27	B, H	„ „	19	145-155°	B, H
46-47	„ „ -(99:1)	161	H	„ „	118	159-169°	H
48-49	„ „ „	68	„	„ „	50	240-244°	H
50	„ „ -(98:2)	14	„				
51-52	„ „ „	16	H, Hl				
53	„ „ „	4					
54-55	„ „ -(95:5)	7	H, Hl, E, F				
56-57	„ „ -(9:1)	3					
58-59	„ „ -(4:1)	3					
60-62	«Gemisch»+5% AcOH	417	UV.-negat.				
63	«Gemisch»+10% AcOH	60	„ „				

Bei den Kristallen aus Fr 46-47 handelte es sich um eine niedrig schmelzende Modifikation.

#### Untersuchung der Proben b + c

Vortrennung durch grobe Verteilungschromatographie. Die 2,143 g Material wurden wie Probe a getrennt und gaben die in Tab. 6 genannten Ausbeuten.

Tabelle 6. *Grobe Verteilungschromatographie von 2,143 g Trockensekret (Proben b + c)*

Fraktions Nr.	Eluiermittel		Eindampfrückstand roh	
	Art	Menge total in ml	Menge in mg	Weitere Verarbeitung und Aussehen
1-13	Chf	495	213	Chromatogr. an Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
14-18	Chf-Bu-(9:1)	125	19	n. u. (hellbraun amorph)
19	„ „ -(8:2)	200	254	„ „ „
20	Me	erschöpfend extrahiert	300	„ „ (dunkelbr. amorph)

Die 213 mg Chf-Eluat (Fr 1-13 von Tab. 6) wurden an 6,5 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert; vgl. Tab. 7.

Tabelle 7. Chromatographie von 213 mg Chf-Eluat von Tab. 6

Fraktions-Nr.	Eluiermittel je 100 ml pro Fr	Eindampfrückstand					
		roh		Kristalle			
		Menge in mg	Flecke im Pch	aus	Menge in mg	Smp.	Flecke im Pch
1-3	Pe-Be-(9:1)	6					
4-5	Be	3					
6-7	Be-Chf-(95:5)	2					
8-9	„ „ -(9:1)	0					
10-11	„ „ -(4:1)	5	D				
12-14	„ „ -(1:1)	9	R				
15	„ „ -(1:3)	2	R				
16-18	„ „ „	27	B				Chromatogramm an SiO <sub>2</sub>
19	„ „ „	8	B (T) (H)				
20-21	Chf	17	„ „ „				
22-23	„	8	T (A) (M1)				
24	Chf-Me-(99,5:0,5)	4	„ (N)H(M1)				
25	„ „ „ „	7	H	An-Ae	11	159-168°	H (tief schmelzende Form)
26-28	„ „ „ -(99:1)	21	H				
29-36	„ „ „ -(98:2)	16	H, HI				
37	«Gemisch» + 5% AcOH	76	UV.-negativ				
38	«Gemisch» + 10% AcOH	46	„ „				n. u.

Die Fr. 16-21 wurden nochmals an 1,6 g SiO<sub>2</sub> chromatographiert. Die mit Be-Chf-(1:2) eluierten Anteile (20 mg) gaben aus An-Ae 10 mg reines B in Kristallen vom Smp. 190-210°.

### Beschreibung und Identifizierung der isolierten Stoffe

*R* = *Resibufogenin* aus Probe a. Aus An-W farblose Blättchen, zum Teil in Drusen, Smp. 99-103°,  $[\alpha]_D^{22} = -8,2^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,12$  in Chf). Nach Mischprobe, Pch und Färbungen mit SbCl<sub>3</sub> und 84-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> identisch mit authentischem Material.

*3-O-Acetyl-resibufogenin*. 7,8 mg amorphes Resibufogenin aus Probe a (ML obiger Kristalle) wurden mit 0,1 ml abs. Py und 0,1 ml (Ac)<sub>2</sub>O 24 Std. auf 37° erwärmt. Die übliche Aufarbeitung gab 9 mg neutrales Rohprodukt. Aus An-Ae 2,6 mg farblose Blättchen, Smp. 224-232°. Nach Mischprobe und Pch (System Cy/Dimethylformamid) identisch mit authentischem Material.

*B* = *Bufotalinin* aus Probe a. Aus An-Ae farblose Prismen, Smp. 173-190°,  $[\alpha]_D^{24} = +16,0^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,2$  in Chf). Nach Mischprobe, Pch und Farbreaktionen identisch mit authentischem Material.

Die Kristalle aus Probe b zeigten Smp. 190-210° und waren nach denselben Kriterien identisch mit authentischem Bufotalinin.

*H* = *Hellebrigenin* aus Probe a. Aus An-Ae farblose Blättchen, Smp. 227-233°,  $[\alpha]_D^{22} = +20,6^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,30$  in An). Nach Mischprobe, Pch und Farbreaktionen identisch mit authentischem Material.

*O-Acetyl-hellebrigenin*. 20 mg Hellebrigenin aus Probe a lieferten nach Acetylierung 21 mg amorphes Rohprodukt. Aus An-Ae 11,0 mg farblose Blättchen, Smp. 233-244°,  $[\alpha]_D^{22} = +38,1^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1$  in Chf). Nach Mischprobe, Pch und Farbreaktionen identisch mit authentischem Material.

Das Hellebrigenin aus Präp. b+c zeigte Smp. 159–168° (tief schmelzende Form),  $[\alpha]_D^{25} = +17,2^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,1$  in An). Nach Mischprobe, Pch und Farbreaktionen identisch mit authentischem Material. Das daraus bereitete O-Acetylderivat gab aus An-Ae farblose, zu Büscheln vereinigte Blättchen, Smp. 220–240°. Mischprobe, Pch und Farbreaktionen wie oben.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Das getrocknete Paratoidensekret von *Bufo regularis* REUSS aus Erythrea und aus SW-Afrika wurde auf Bufadienolide untersucht, wobei nur bei der letztgenannten Probe sicher bewiesen werden konnte, dass sie von *B. regularis* stammt. Hauptgenin war in beiden Fällen Hellebrigenin (3,5 bzw. 0,5 %). Daneben wurde viel Bufotalinin (1 bzw. 0,5 %) und Resibufogenin (1 bzw. 0,3 %) gefunden. Das Material aus Erythrea gab jeweils die höheren Ausbeuten. Die in kleinen Mengen daneben papierchromatographisch nachgewiesenen Stoffe waren in den zwei Proben teilweise verschieden.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

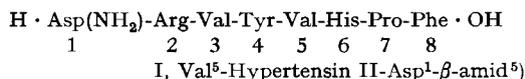
### 75. Die sterische Einheitlichkeit des synthetischen Val<sup>5</sup>-Hypertensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amids<sup>1)</sup>

von B. Riniker und R. Schwyzer

(18. II. 61)

Vor etwas mehr als zwei Jahren wurde die erste Synthese der im Titel erwähnten Verbindung I aus unserem Arbeitskreise veröffentlicht<sup>2)</sup>. Vorläufige Versuche mit enzymatischen Methoden hatten ergeben, dass das Octapeptid weitgehend optisch einheitlich ist, d. h. alle Aminosäurereste in der natürlichen L-Konfiguration enthält<sup>3)</sup>.

Inzwischen hatten wir Gelegenheit, die Verbindung nach derselben Vorschrift in grösserem Maßstabe herzustellen<sup>4)</sup>. Auch in diesem Produkte liessen sich auf enzymatischem Wege keine Reste von D-Aminosäuren nachweisen.



<sup>1)</sup> Diese Arbeit ist u. a. auch als Studie im Rahmen des Programmes der Kommission für Proteine (Vorsitzender: Prof. Dr. K. BAILEY, Cambridge) der Biochemischen Sektion der IUPAC zur Abklärung der Frage, ob sich käufliches Val<sup>5</sup>-Hypertensin II-β-amid zur Reinheitsprüfung von proteolytischen Enzymen eignet, gedacht.

<sup>2)</sup> R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* 41, 1287 (1958).

<sup>3)</sup> R. SCHWYZER, *Records of Chemical Progress* 20, 147 (1959); R. SCHWYZER & H. TURRIAN, *Vitamins and Hormones*, Vol. XVIII, 237 (1960), Academic Press Inc., New York.

<sup>4)</sup> In Zusammenarbeit mit den Herren Drs. E. TAGMANN, A. F. BURI und M. FEURER in unserer Firma. Val<sup>5</sup>-Hypertensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid ist der Wirkstoff des Präparates Hypertensin CIBA®.

<sup>5)</sup> Abgekürzte Peptidformeln im wesentlichen nach E. BRAND & J. T. EDSALL, *Ann. Rev. Biochemistry* 16, 223 (1947); gross geschriebene Symbole bedeuten die natürliche (L-)Form, klein geschriebene die unnatürliche (D-).