

13. Papierchromatographische Prüfung der Sekrete von *Bufo melanostictus* SCHNEIDER und *Bufo asper* GRAVENHORST

Krötengifte, 30. Mitteilung[1]¹⁾

von **E. Iseli, Ek. Weiss, T. Reichstein** und **K. K. Chen**

Zum 60. Geburtstag von Professor DENYS MONNIER

(12. XI. 63)

Kürzlich beschrieben HENDERSON, WELLES & CHEN[2] die pharmakologische Prüfung der Paratoidensekrete der zwei genannten Krötenarten aus Java. Neben Indolbasen wurden digitalisartig wirksame Stoffe nachgewiesen. Eine chemische Untersuchung des Sekrets von *Bufo melanostictus* hat bereits VAN GILS[3] durchgeführt. Er isolierte drei stickstofffreie, digitalisartig wirksame Komponenten: Bufagin A (nicht rein erhalten), Bufagin B (Smp. 173–175°, Analyse passte auf C₂₉H₄₂O₇) und Bufagin C (Smp. 243–250°, Analyse passte auf C₂₃H₃₀O₆). Leider war es uns nicht möglich, diese Präparate zum Vergleich heranzuziehen. Hier wird über die papierchromatographische Prüfung der zwei genannten Sekrete auf ihren Gehalt an Bufogeninen berichtet.

Fleck	Stärke ²⁾	Event. Identifizierung sowie Angabe der Färbung nach Spritzen mit SbCl ₃ (22-proz. in CHCl ₃) sowie anschliessendem Erhitzen auf ca. 110° bei Tageslicht, und in Klammern Fluoreszenz im UV.
St	+	Sterine, vermutl. Mischung, violett-orange. Keine Absorption im UV. bei 300 m μ .
X1	(+)	Unbekanntes, bräunlich. Identität mit Resibufogenin nicht ausgeschlossen.
X2	(+)	Unbekanntes, braun, Identität mit Bufalin möglich.
M	++	Marinobufagin, braunviolett (orangebraun).
Bt	+	Bufotalin, graublau (rotbraun).
X3	(+)	Unbekanntes, Spur.
X4	+	Unbekanntes, orangegelb (orangebraun).
X5	(+)	Unbekanntes, Spur.
H	+++	Hellebrigenin = Bufotalidin, orange → grün (oliv gelb).
X6	(+)	Unbekanntes, Spur.
X7	(+)	Unbekanntes, Spur, UV.-Fluoreszenz.
X8	(+)	Unbekanntes, Spur, UV.-Fluoreszenz.
X9	(+)	Unbekanntes, Spur, UV.-Fluoreszenz grün.

Die Beschaffung des Ausgangsmaterials ist in der genannten Notiz[2] beschrieben. Die Extraktion der Proben geschah wie früher beschrieben[4]. Für die Papierchromatographie dienten drei Systeme (Fig. 1–4). Der Nachweis erfolgte durch Photokopie

¹⁾ Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 119.

unter Verwendung eines Monochromators[5] und nachträglicher Anfärbung mit SbCl_3 [6][7]. Wegen Materialmangels konnten keine präparativen Trennungen durchgeführt werden. Die Resultate sind, wie in früheren Fällen[4][8], mit der üblichen Unsicherheit behaftet, die allen nur papierchromatographisch durchgeführten Identifizierungen anhaftet.

Die Resultate sind besonders aus den Fig. 1–4 ersichtlich.

Bufo melanostictus SCHNEIDER (1799). 18 mg Trockensekret gaben 1,5 mg Methanol-Chloroform-lösliche Anteile. Diese zeigten in den Papierchromatogrammen in den drei Systemen insgesamt die folgenden ca. 13 Flecke (Reihenfolge in zunehmender Polarität). Davon entsprechen mindestens drei (M, Bt und H) nach Laufstrecke und Färbung bekannten Bufogeninen, dasselbe dürfte wahrscheinlich auch für die nur in kleinen Mengen vorhandenen Stoffe X1 und X2 zutreffen.

Bufo asper GRAVENHORST (1829). 2,5 mg Trockensekret gaben 1 mg Methanol-Chloroform-lösliche Anteile. Dieses Trockensekret war somit relativ reich an Steroiden. In den Papierchromatogrammen waren die folgenden ca. 9 Flecke sichtbar, von denen sich nur 2–3 identifizieren liessen.

Fleck	Stärke ²⁾	Event. Identifizierung sowie Angabe über Färbungen wie oben
A1	(+)	Unbekanntes, bräunlich, Identität mit Resibufogenin nicht ausgeschlossen.
A2	++	Unbekanntes, grüngelb (leuchtend hellgrün), sicher neu.
M	+	Marinobufagin, braunviolett (orange braun).
Bt	+++	Bufotalin, graublau (rotbraun).
A3	+++	Unbekanntes, keine Färbung mit SbCl_3 .
A4	+	Unbekanntes, grüngelb (gelb), läuft wie Telocinobufagin aber Färbung anders.
A5	+	Unbekanntes, blaugrau (orange), möglicherweise identisch mit Desacetylbufotalin.
A6	(+)	Spur, Unbekanntes, blau.
A7	(+)	Spur, Unbekanntes, evtl. identisch mit X9, UV.-Fluoreszenz grün.

Bei *Bufo melanostictus* ist Hellebrigenin die Hauptkomponente, gefolgt von Marinobufagin. Ob es sich bei den nicht identifizierten Stoffen X1–X9 durchwegs um neue Verbindungen handelt, ist ungewiss. Weitere Untersuchungen in präparativem Maßstab sind vorgesehen. Auf Grund der Daten vermuten wir, dass Bufagin C von VAN GILS[3] mit Hellebrigenin identisch war.

Besonders interessant ist das Sekret von *Bufo asper*. Hauptgenine sind Bufotalin sowie zwei nicht identifizierte Genine, A2 und A3, von denen zumindest A2 einen neuen Stoff darstellen dürfte.

Der eine von uns (E. I.) dankt dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit.

²⁾ (+) sehr schwache, +++ sehr starke Flecke in der Photokopie.

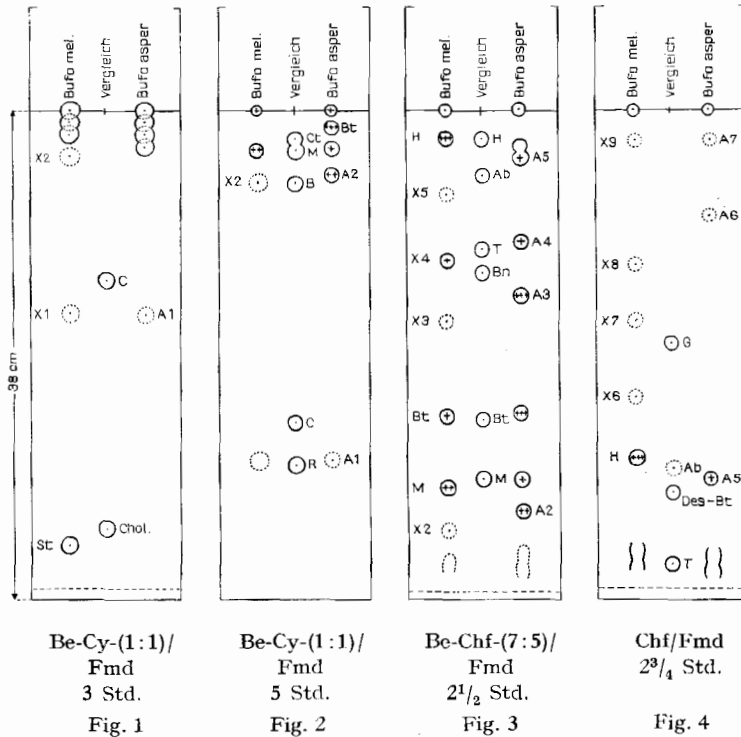


Fig. 1-4 sind Beispiele von Papierchromatogrammen, schematisiert aber massgetreu. Ausführung nach früheren Angaben[9]. Wo keine Front (gestrichelt) eingezeichnet ist, wurde sie abtropfen gelassen.

Vergleichsstoffe mit Angabe der Färbung mit SbCl_3 (wie oben).

- Ab = Arenobufagin [10], keine Färbung.
- B = Bufalin [11], grün-blaugrau (rotbraun).
- Bn = Bufotalin [12], orange \rightarrow gelbgrün (weissblau).
- Bt = Bufotalinin [13], graublau (rotbraun).
- C = Cinobufagin [14], grüngelb (gelb).
- Chol = Cholesterol, orange.
- Ct = Cinobufotalin [15], violettblau (orangebraun).
- Des-Bt = Desacetylbufotalin [16], blaugrau (ockerbraun).
- G = Gamabufotalin [17], blaugrau (braunrot).
- H = Hellebrigenin [18] = Bufotalidin [19], orange-grün (olivgelb).
- M = Marinobufagin [20], braunviolett (orangebraun).
- R = Resibufogenin [21], blassviolett (rotbraun).
- T = Telocinobufagin [22], violettblau (grauviolett).

SUMMARY

According to paperchromatograms the paratoid secretion of *Bufo melanostictus* SCHNEIDER was found to contain 12 bufogenins. Three of these (M, Bt und H) have been identified with the known genins Marinobufagin, Bufotalin and Hellebrigenin. Two other ones (X1 and X2) are possibly identical with Resibufogenin and Bufalin.

By the same method the secretion of *Bufo asper* GRAVENHORST was found to contain 9 bufogenins. A1 again is possibly identical with Resibufogenin; two others have been shown to be Marinobufagin (M) and Bufotalin (Bt). One genin (A2), present in relatively large amount, should certainly be a new substance.

Institut für Organische Chemie der Universität, 19 St. Johannis-Ring, Basel, sowie Department of Pharmacology, Indiana University, School of Medicine, 1100 West Michigan Street, Indianapolis 7, Indiana, USA (supported by US PHS Grant No. HE.-07714).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 29, Mitt.: M. S. RAGAB, H. LINDE & KUNO MEYER, *Helv.* **45**, 1794 (1962).
 - [2] F. G. HENDERSON, J. S. WELLES & K. K. CHEN, *Science* **136**, 775 (1962).
 - [3] G. E. VAN GILS, *Geneesk. Tijdschr. Ned.-Indië* **78**, 282 (1938); *Biol. Abstr.* **72**, 3056 (1938); *Acta Brevia Neerland. Physiol., Pharmacol., Microbiol.* **8**, 84 (1938); *Chem. Abstr.* **32**, 8010 (1938).
 - [4] H. SCHRÖTER, CH. TAMM, T. REICHSTEIN & V. DEULOFEU, *Helv.* **41**, 140 (1958).
 - [5] W. ARNOLD, R. BÜHRER, J. V. EUW, E. LÜSCHER, O. SCHINDLER, K. STICH, P. ZOLLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **46**, 178 (1963).
 - [6] R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* **34**, 2278 (1951); D. LAWDAY, *Nature* **170**, 415 (1952).
 - [7] Methodik vgl. auch J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1270 (1957); R. BOLLIGER & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1659 (1957).
 - [8] 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).
 - [9] O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 108 (1951); H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 357 (1953).
 - [10] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **43**, 1950 (1960).
 - [11] K. MEYER, *Helv.* **32**, 1238 (1949).
 - [12] H. SCHRÖTER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **41**, 720 (1958).
 - [13] K. MEYER, *Helv.* **32**, 1993 (1949).
 - [14] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **43**, 1955 (1960).
 - [15] F. BERNOULLI, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **45**, 240 (1962).
 - [16] J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1270 (1957).
 - [17] K. MEYER, *Helv.* **32**, 1599 (1949).
 - [18] J. SCHMUTZ, *Helv.* **32**, 1442 (1949).
 - [19] H. R. ÜRSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 883 (1955).
 - [20] H. SCHRÖTER, R. REES & K. MEYER, *Helv.* **42**, 1385 (1959).
 - [21] H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **42**, 807 (1959).
 - [22] K. MEYER, *Helv.* **32**, 1593 (1949).
-