

Thiosemicarbazon von Ic: Aus 1.4 g *Ic* und 1.28 g *Thiosemicarbazid-hydrochlorid* (0.01 Mol) erhält man in üblicher Weise gelbe Stäbchen, Schmp. 224°. Ausb. 1.3 g (60.6% d. Th.).

$C_7H_{10}N_4S_2$ (214.3) Ber. C 39.23 H 4.70 N 26.15 S 29.92
Gef. C 39.34 H 4.61 N 25.81 S 29.72

4.5-Dimethyl-thiazolyl-(2)-hydrazon von Ic (IIc): a) 1.4 g *Ic* werden in 20 ccm Äthanol mit 1.42 g *4.5-Dimethyl-thiazolyl-(2)-hydrazin*⁹⁾ (0.01 Mol) 20 Min. erwärmt. Auf Zugabe von Wasser fallen gelbe Nadeln aus, die nach dem Umlösen aus wäbr. Äthanol bei 217° schmelzen. Ausb. 1.85 g (69.5% d. Th.).

$C_{11}H_{14}N_4S_2$ (266.4) Ber. C 49.60 H 5.30 N 21.04 Gef. C 49.50 H 5.19 N 21.12

b) Durch Kondensation molarer Mengen von *4.5-Dimethyl-thiazol-aldehyd-(2)-thiosemicarbazon* und *3-Brom-butanon-(2)* erhält man gelbe Nadeln, Schmp. und Misch-Schmp. mit Substanz aus a) 217°.

RUDOLF TSCHESCHE und ULRICH DÖLBERG

Über pflanzliche Herzgifte, XXXIII¹⁾

ZUR KENNTNIS DER BUFADIENOLID-GLYKOSIDE
AUS *BOWIEA VOLUBILIS* HARVEY

Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität Hamburg
(Eingegangen am 18. Juli 1957)

Aus einem in Deutschland gewachsenen Muster von *Bowiea volubilis* H. konnte durch Verhinderung der Selbstfermentation Gluco-bovosid A isoliert werden. Der Zucker in den früher beschriebenen Bovotoxinen wurde als Thevetose ermittelt.

Die Untersuchung der herzwirksamen Inhaltsstoffe der Zwiebeln von *Bowiea volubilis* Harvey wird durch den Umstand besonders erschwert, daß die Muster dieser Droge aus bisher nicht bekannten Gründen sich in ihren Inhaltsstoffen in Art und Menge ganz wesentlich unterscheiden. Während wir aus einer südafrikanischen Sorte aus der Gegend von Umzinto, südlich Durban, die früher beschriebenen²⁾ „Bovotoxine“, zusammen mit Bovochrysoid und Bovopurpurosid, in guter Ausbeute gewinnen konnten, erbrachten neue Sendungen aus derselben Gegend nur unbefriedigende Ergebnisse³⁾. Vielfach war ein Bufadienolidgehalt nur gerade nachweisbar. Schon A. KATZ³⁾ hat auf den unterschiedlichen Gehalt der Droge verschiedener

1) XXXII. Mittell.: R. TSCHESCHE, S. WIRTZ und G. SNATZKE, Chem. Ber. **88**, 1619 [1955].

2) R. TSCHESCHE, H.-W. SARAU und K. SELLHORN, Chem. Ber. **88**, 1612 [1955].

3) Helv. chim. Acta **36**, 1344, 1417 [1953]; **33**, 1420 [1950]; vgl. auch **37**, 451, 833 [1954]; **38**, 1565 [1955] und **40**, 487 [1957]; sowie Pharmac. Acta Helvetiae **29**, 77, 369 [1954], Experientia [Basel] **12**, 285 [1956].

*) Wir möchten auch hier Herrn Dr. K. K. CHEN, Indianapolis, für die Überlassung mehrerer Muster südafrikanischer Zwiebeln sehr herzlich danken. Ebenso erhielten wir ein solches Muster durch die Firma KNOLL AG., Ludwigshafen a. Rh., für das wir auch hier unseren besonderen Dank ausdrücken möchten.

Provenienz hingewiesen, ohne daß bisher eine Klärung dieser Frage möglich gewesen ist. Die Verschiedenartigkeit beruht sicherlich nicht auf äußeren Merkmalen, wie große oder kleine Zwiebeln, bzw. grüne oder weiße Sorte, sondern muß entweder auf botanische Unterschiede oder darauf zurückzuführen sein, daß klimatische Bedingungen einen entscheidenden Einfluß auf den Gehalt der Zwiebeln ausüben.

Durch die Firma KNOLL AG., Ludwigshafen, erhielten wir ein weiteres Muster Bowiea-Zwiebeln, die bei Ludwigshafen gewachsen waren. Obwohl äußerlich sich nicht von unseren früheren Sorten unterscheidend, lieferten sie nach Selbstfermentation ohne Schwierigkeiten Bovosid A, das bereits KATZ als ein Hauptglykosid seiner Zwiebeln erkannt hatte und das wir früher nie beobachten konnten. Bovochrysoid, Bovopurpurosid oder die früher beschriebenen Bovotoxine waren nicht nachweisbar. In untergeordneter Menge traten noch zwei weitere Bufadienolid-derivate auf, wahrscheinlich verschieden von den bisher beschriebenen, über die später berichtet werden soll.

Wurde jedoch die Selbstfermentation der neuen Zwiebeln bei der Aufarbeitung verhindert, so konnte kaum Bovosid A isoliert werden. Dagegen wurde ein unbekanntes Glykosid kristallisiert, das nur in Form seines Pyridinkomplexes gut isolierbar war; ohne diese Base waren keine deutlichen Kristalle erzielbar. Die Reinigung von den oben genannten Begleitern erfolgte durch Verteilungschromatographie an Cellulosepulver^{*)}. Das neue Glykosid erwies sich als Gluco-bovosid A, bei der Spaltung mit Strophanthobiase aus *Strophanthus kombé* lieferte es D-Glucose und Bovosid A. Die Bowiea-Zwiebeln enthalten daher eine Glucosidase, die endständig gebundene Glucose aus dem genuinen Glykosid in Freiheit setzt. Die Verhältnisse entsprechen also denen, wie sie von A. STOLL und J. RENZ⁴⁾ bei verschiedenen herzgifteführenden Pflanzen eingehender untersucht worden sind.

Herr Prof. HILDEBRANDT, Bad Nauheim ^{**)}, fand für Bovosid A eine Toxizität für das Meer-schweinchen von 25.8 γ /100 g, während er für Gluco-bovosid A einen Wert von 135.0 γ /100 g beobachtete. Für die Katze stellte Herr Dr. K. K. CHEN, Indianapolis ^{**)}, für Bovosid A einen Wert von 0.1235 mg \pm 0.0058 an 10 Katzen fest, während verschiedene Präparate der gleichen Substanz von KATZ die Zahlen 0.1293, 0.1273 und 0.1318 ergeben hatten.

In der vorhergehenden Arbeit²⁾ über Bowiea-glykoside waren eine Reihe von „Toxinen“ beschrieben worden: Bovoeolotoxin, Bovoxanthotoxin, Bovocyano-toxin und Bovoerythrotoxin. Ihre Summenformeln mit 31 C-Atomen ließen auf einen zuckerartigen Rest von 7 C-Atomen schließen, der wahrscheinlich auch die in den Toxinen nachgewiesene Methoxylgruppe enthielt. Es war aber bei der Hydrolyse mit alkoholischer Säure, die relativ energisch vorgenommen werden mußte, niemals ein mit Anilinphthalat oder Triphenyltetrazoliumchlorid nachweisbarer Zucker gefaßt worden. Dagegen erhielten wir nun mit dem Perjodat-Benzidin-Reagenz nach *Viscontini*⁵⁾, nicht aber mit den anderen genannten Reagenzien, im Papierchromato-

^{*)} Dieses Verfahren in der hier benutzten Form wurde von Herrn Dr. G. GRIMMER in unserem Institut zuerst erfolgreich zur Isolierung von Herzgiften verwendet.

⁴⁾ *Enzymologia* [Amsterdam] 7, 362 [1939]; vgl. auch H. HELFENBERGER und T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* 31, 1470, 2097 [1948].

^{***)} Beiden Herren sei auch hier vielmals für ihre Untersuchungen gedankt.

⁵⁾ M. VISCONTINI, D. HOCH und P. KARRER, *Helv. chim. Acta* 38, 642 [1955].

gramm eine lokalisierte Anfärbung. Als wir nun auch Bovosid A in der gleichen Weise hydrolysierten (Methanol/*n* HCl 1:1, 1 Stde.), fanden wir den gleichen mit Perjodat nachweisbaren Fleck, daneben war die L-Thevetose aus dem Bovosid A mit Anilinphtalat kaum noch nachweisbar. Als wir nun zur Spaltung mit Eisessig-Salzsäure nach KILIANI übergingen, ließ sich die Thevetose sowohl im Bovosid A als auch im Bovoxanthotoxin und Bovoerythrotoxin ohne Schwierigkeiten auffinden. Vermutlich dürften auch Bovocyanotoxin und Bovoelotoxin Thevetose enthalten.

Zur Klärung der Frage, ob die L-Thevetose mit alkoholischer Säure eine Veränderung erfährt, wurde der aus Neriifolin gewonnene Zucker in der gleichen Weise wie bei der Glykosidspaltung erhitzt. Danach trat im Papierchromatogramm neben Thevetose der neue Perjodat-positive Fleck an der gleichen Stelle auf, wo wir ihn bei der Glykosidspaltung beobachtet haben. Die neue Substanz erwies sich als nicht mehr mit wäßriger Säure oder Kiliani-Mischung in Thevetose umwandelbar. Zu erwähnen bleibt noch, daß die isomere D-Digitalose diese Veränderung mit alkoholischer Säure nicht erfährt. Bei den Bovotoxinen haben offenbar die angewandten energischen Spaltungsbedingungen mit alkoholischer Säure stets zur völligen Veränderung der Thevetose geführt.

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für die Unterstützung dieser Arbeit und der Firma KNOLL AG., Ludwigshafen, insbesondere auch Herrn Dr. STÄHLIN, für die Überlassung und Extraktion der untersuchten Muster von *Bowiea volubilis* Harvey.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die papierchromatographischen Versuche wurden in den Systemen Octanol/Pentanol/Wasser/Formamid (6:2:1:4) (Gemisch I)⁶⁾, Octanol/Pentanol/Wasser/Formamid (6:2:8:2) (Gemisch II), Pentanol/Wasser und Xylol/Butanon (1:1), gesättigt mit Formamid (Gemisch III)⁷⁾, durchgeführt.

Die Sichtbarmachung auf dem Papier erfolgte mit SbCl₃, bzw. durch Beobachtung unter der kurzwelligen Ultraviolettlampe Original Hanau PL 320. Die bei 295--300 m μ absorbierenden Bufadienolidderivate erschienen hierbei als dunkle Flecke auf dem schwach bläulich fluoreszierenden Untergrund des Papiers.

Aufarbeitung von Muster I

Bei diesem Muster handelte es sich um 40 kg *Bowiea*-Zwiebeln, die aus Samen südafrikanischer *Bowiea*-Pflanzen in Ludwigshafen gezogen worden waren. Die Ernte erfolgte nach Ende der Vegetationsperiode im Spätherbst und die Aufarbeitung im Frühjahr vor Beginn der Vegetationsperiode. Dabei wurde das früher benutzte Verfahren (mit voraufgehender Selbstfermentation) angewandt. Es resultierten:

11.6 g Äther-Extrakt;	6.4 g Chloroform-Extrakt A;
8.7 g Chloroform-Extrakt B;	15.3 g Chloroform/Äthanol (2:1)-Extrakt.

Der Chloroform-Äthanol-Extrakt enthielt unbedeutende Mengen an Bufadienoliden, wie aus dem Fehlen des UV-Absorptionsmaximums bei 300 m μ hervorging.

Bovosid A: Der Äther-Extrakt und die beiden Chloroform-Extrakte wurden an Al₂O₃ chromatographiert. Die jeweils mit Chloroform/1% Methanol eluierten Fraktionen waren

⁶⁾ R. TSCHESCHE, G. GRIMMER und F. SEEHOFER, Chem. Ber. **86**, 1235 [1953].

⁷⁾ F. KAISER, Chem. Ber. **88**, 556 [1955].

papierchromatographisch nahezu einheitlich und ließen sich aus Methanol/Chloroform/Äther leicht kristallisieren. Nadeln, Schmp. 244–251°. Beim Kristallisieren aus stärker methanolhaltiger Lösung wurde auch die von KATZ³⁾ beschriebene lösungsmittelhaltige Modifikation beobachtet: Schmp. 215–225°, dicke Prismen. Ausb. 4.55 g (= 0.011% der frischen Zwiebeln).



$[\alpha]_D^{20}$: $-74 \pm 4^\circ$ (Methanol).

R_F -Werte: Gemisch I 0.75, Gemisch II 0.27, Gemisch III 0.39.

Färbung mit SbCl_3 auf Papier: orange (Tages- und UV-Licht).

Die folgenden Fraktionen der Chromatographie der Chloroform-Extrakte enthielten neben wenig Bovosid A drei weitere Bufadienolide. Eines davon (R_F -Wert in Pentanol/Wasser 0.42, Färbung mit SbCl_3 gelb-orange), das jedoch nur in untergeordneter Menge vertreten war, erwies sich als das später aus Muster II in großer Menge isolierte Gluco-bovosid A.

Aufarbeitung von Muster II

Herkunft der Zwiebeln (39 kg) und Zeitpunkt der Aufarbeitung waren dieselben wie bei Muster I, doch wurde diesmal eine vorherige Selbstfermentation möglichst verhindert. Dabei wurde das zu Brei zerkleinerte Material sofort in überschüssiges Methanol eingebracht und der wäßrig-methanolische Extrakt nach Abpressen und Entfernen des Methanols zuerst mit Essigester und dann mit Chloroform/Äthanol ausgezogen. Es wurden erhalten:

63.1 g Essigester-Extrakt; 15.9 g Chloroform/Äthanol-Extrakt.

Gluco-bovosid A: Die Auftrennung der Extrakte gelang durch Verteilungschromatographie an Cellulose mit dem zweiphasigen System Äther/Äthanol/Wasser (12:4.5:5.3) (stationär: schwere, mobil: leichte Phase).

600 g Cellulosepulver wurden mit Methanol $\frac{1}{2}$ Stde. lang kräftig zu einem dünnflüssigen, homogenen Brei verrührt und dieser in kleinen Portionen in eine etwa zur Hälfte mit Methanol gefüllte Chromatographiesäule gegossen, so daß sich die Cellulose gleichmäßig in feiner Verteilung absetzen konnte. Dann wurde das Methanol mit der schweren Phase des Äther-Äthanol-Wasser-Gemisches restlos herausgewaschen und anschließend vorsichtig die leichte Phase auf die Säule gegeben. Diese verdrängt beim Durchlaufen den Überschuß an stationärer Phase, bis sich zwischen beiden Phasenmengen an der Cellulose ein Gleichgewicht eingestellt hat. Dazu läßt man die mobile Phase so lange passieren, bis sie keine Anteile an stationärer Phase mehr mitreißt. Insgesamt wurden auf diese Weise 1.2/ stationäre Phase verdrängt. Nach dieser Vorbereitung wurden ca. 15 g Substanzgemisch, in 80–100 ccm mobiler Phase gelöst (Auflösung unter teilweiser Entmischung des Lösungsmittels), auf die Säule gebracht und eben in die Cellulosefüllung einsickern gelassen. Dann wurde mit mobiler Phase eluiert. Nach einem Vorlauf von ca. 1 l wurden zunächst vier Fraktionen zu je 300 ccm aufgefangen, dann fortlaufend Fraktionen zu je 600 ccm.

Durch 6 derartige Chromatographien konnten der Essigester- und Chloroform/Äthanol-Extrakt (zus. 79 g) aufgetrennt werden.

Die Fraktionen 2–4 enthielten fast ausschließlich Bovosid A, die Fraktionen 6–9 ein Gemisch hauptsächlich zweier Bufadienolide, nach dem Papierchromatogramm identisch mit denen aus den Chloroform-Extrakten von Muster I. Ab Fraktion 10 erschien *Glucobovosid A*, in den Fraktionen 12–15 meist papierchromatographisch einheitlich. Aus diesen Fraktionen ließ es sich aus Pyridin/Äther kristallisiert gewinnen. Schmp. nach dreimaligem Umkristallisieren 188–196°. Die Analysendaten sowie die Tatsache, daß das Glykosid aus Pyridin leicht, aus anderen Lösungsmitteln äußerst schwierig kristallisiert, deuten darauf hin,

daß Pyridin in das Kristallgitter eingebaut wird (kein Gew.-Verlust bei 110° i. Hochvak.). Ausb. 8.6 g (= 0.022%).

$C_{37}H_{54}O_{14} \cdot 1 \text{ Py}$ (801.9) Ber. C 62.90 H 7.42 N 1.75

$\cdot 1\frac{1}{2} \text{ Py}$ (841.5) Ber. C 63.51 H 7.37 N 2.50 Gef. C 63.26 H 7.48 N 2.49

$[\alpha]_D^{20}$: $-66 \pm 2^\circ$ (Methanol, $c = 9.93$). $\lambda_{\max} = 300 \text{ m}\mu$, $\alpha = 7.56$, $\log \epsilon = 3.80$ (Mol.-Gew. = 841.5). Im UV- wie im IR-Spektrum traten die Absorptionsbanden des Pyridins auf.

R_F -Werte: Pentanol/Wasser 0.42; Gemisch II 0.87.

Färbung mit $SbCl_3$: gelb-orange (Tageslicht und UV).

Wie Bovosid A oxydiert sich Gluco-bovosid A bei längerem Stehenlassen der methanol. Lösung an der Luft. Die Lösung nimmt saure Reaktion an; im Papierchromatogramm in Pentanol/Wasser tritt ein weitlaufender Fleck neu hinzu, welcher der entstandenen Säure zukommen dürfte.

Bei der Glykosidspaltung nach KILIANI (mit Eisessig/Wasser/konz. HCl (55:80:15), 1 Stde. 100°) ließen sich zwei Zucker nachweisen, die durch papierchromatographischen Vergleich in den Systemen n-Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3), n-Butanol/Äthanol/Wasser (5:1:4), n-Butanol/Essigest:er/Wasser (2:1:2) und n-Butanol/Wasser als *Thevetose* und *Glucose* identifiziert wurden.

Bei der Glykosidspaltung mit Methanol/n HCl (1:1) (1 Stde. zum Sieden erhitzt) trat *Thevetose* nur schwach oder garnicht auf. Dafür wurde mit dem Reagenz nach VISCONTINI⁵⁾ in dem System Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3) ein Fleck mit dem R_F -Wert 0.40 beobachtet.

Abspaltung der Glucose: 90 mg *Gluco-bovosid A* und 100 mg *Strophanthobiase* wurden in 100 ccm Wasser gelöst, mit etwas Toluol bedeckt und 6 Tage bei 37° stengelassen. Nach Einengen auf ca. 10 ccm wurde das Ferment durch Aufkochen mit 100 ccm Äthanol ausgeflockt und abfiltriert, das Filtrat wurde i. Vak. zur Trockne gebracht. Wie sich papierchromatographisch zeigen ließ, war erst ein kleiner Teil des Glykosids gespalten worden. Die Fermentation wurde daher in gleicher Weise weitere 6 Tage fortgesetzt. Doch trotz einer nochmaligen Erneuerung des Ferments war selbst nach weiteren 7 Tagen noch etwa $\frac{1}{3}$ des *Gluco-bovosids A* unverändert geblieben.

Nun wurde der Trockenrückstand nach Entfernen der *Strophanthobiase* in 5 ccm Wasser aufgenommen und 5 mal mit Chloroform/Äthanol (2:1) ausgezogen. Die wäßrige Lösung enthielt *Glucose* und wenig *Gluco-bovosid A*. Die Chloroform-Extrakte wurden an 1 g Al_2O_3 chromatographiert. Aus den mit Chloroform/2% Methanol eluierten Fraktionen ließ sich *Bovosid A* kristallisieren. Nadeln aus Aceton/Cyclohexan, Schmp. 238–244°. Identifizierung durch IR-Spektrum und papierchromatographischen Vergleich in den Gemischen I, II und III.