

Die Beheizung des Destillationskölbchens erfolgte über ein Metallbad (Wismutlot), das ein einwandfreies Arbeiten im Temperaturbereich von 80–350° ermöglichte.

Sehr wichtig für eine ordnungsgemäße Destillation ist das vorherige sorgfältige Entgasen des zu destillierenden Produkts. Dies wird teilweise erreicht durch Erhitzen auf dem Wasserbad i. Vak. der Wasserstrahlpumpe. Sodann wird die Entgasung i. Hochvak. fortgesetzt und zuletzt das Kölbchen vorsichtig in das geschmolzene Metallbad (80°) getaucht, so daß die Einschmelzstellen des Platinnetzes sich unter der Metallbadoberfläche befinden. Nachdem das unregelmäßige Stoßen nachgelassen hat, wird die Temperatur langsam bis zum Destillationsbeginn gesteigert.

Trennung von Mono- und Disacchariden in Gegenwart von Trisacchariden durch Destillation der Acetate

Beispiel: 2 g β -Pentaacetyl-glucose, 1 g Oktaacetyl-saccharose, 1 g Raffinoschendekaacetat.

Das Zuckergemisch wurde in einem Destillationskölbchen mit eingeschmolzenem Platinnetz bei $5 \cdot 10^{-4}$ Torr destilliert.

Die Badtemperatur wurde innerhalb $\frac{1}{2}$ Stde. auf 170–175° gesteigert. Es muß darauf geachtet werden, daß die im oberen Teil des Kölbchens kondensierten Zuckeracetate laufend mit flüchtender Flamme heruntergeschmolzen werden. Nachdem die Temperatur 30 Min. auf 175° gehalten wurde und der obere Teil des Kölbchens völlig frei von kondensierten Anteilen war, wurde die Destillation unterbrochen und die Monosaccharid-Fraktion isoliert. $[\alpha]_D^{25}$: +3.9°; Ausb. an krist. β -Pentaacetyl-glucose (Schmp. 133°): 1.9 g (95% d.Th.).

Pentaacetate kristallisieren meist sofort nach der Kondensation aus der Gasphase und konnten quantitativ durch mechanisches Entfernen mit einem Spatel isoliert werden.

Der Kolbenrückstand wurde erneut destilliert. Dabei wurde die Temperatur diesmal auf 220–225° gesteigert und gleichfalls 30 Min. konstant gehalten; die übrige Aufarbeitung erfolgte, wie oben bereits ausgeführt wurde.

Die erhaltene Disaccharid-Fraktion zeigte die opt. Drehung $[\alpha]_D^{25}$: +61.7°. Ausb. an krist. Oktaacetyl-saccharose nach dem Umkristallisieren aus Äthanol (Schmp. 84°): 0.75 g (75% d.Th.).

$C_{28}H_{38}O_{19}$ (678.6) Ber. C 49.63 H 5.65 CH_3CO 50.8 Gef. C 49.47 H 5.8 CH_3CO 50.7
Zuletzt destillierte bei einer Badtemperatur von 260° die Trisaccharid-Fraktion über. $[\alpha]_D^{25}$: +101.2°; Ausb. an Raffinose-hendekaacetat nach dem Umkristallisieren aus verd. Äthanol (Schmp. 99°): 0.8 g (80% d.Th.).

10. Rudolf Tschesche und Kurt Sellhorn: Über pflanzliche Herzgifte, XXI. Mitteil.*): Die herzwirksamen Verbindungen von *Bowiea volubilis* Harvey und *Bowiea kilimandscharica* Mildbread

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chem. Staatsinstituts der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 21. Juni 1952)

Aus *Bowiea volubilis* Harvey (große, grüne Sorte) wurde ein neues Glykosid, das Bovosid D, $C_{31}H_{44}O_{10}$, isoliert, das Thevetose als Zuckerkomponente enthält. Ferner wurden 2 nicht bekannte Aglykone, das Bovogenin E mit der möglichen Formel $C_{24}H_{34}O_9$ (+2 CH_3CO ?) und das Kilimandscharogenin A, $C_{24}H_{34}O_9$, erhalten. Das letztgenannte Aglykon konnte auch aus *Bowiea kilimandscharica* Mildbread gewonnen werden, neben einer weiteren vermutlich zuckerfreien Verbindung, die als Kilimandscharogenin B ($C_{24}H_{34}O_9$ + 2 CH_3CO ?) bezeichnet wurde.

Bowiea volubilis Harvey

Im Jahre 1950 hat A. Katz¹⁾ über die herzwirksamen Glykoside von *Bowiea volubilis* Harvey berichtet, von denen er 3 isolieren konnte, die er mit Bovo-

*) XX. Mitteil.: R. Tschesche, G. Grimmer u. F. Neuwald, Chem. Ber. 85, 1103 [1952].

¹⁾ Helv. chim. Acta 33, 1420 [1950].

sid A, B und C bezeichnete. Die Ausbeuten betrugen 0.01, 0.002 und 0.0013 % des Gewichts der frischen Zwiebeln. Das Vorkommen von freien Aglykonen erwähnte er nicht. Die Genine dieser Glykoside gehörten dem Typ mit 24 C-Atomen an, der einen doppelt ungesättigten Lacton-Sechsring in der Seitenkette des Steran-Systems enthält. Als Ausgangsmaterial dienten ihm die kleinen, weißen Zwiebeln der genannten Pflanze, während wir hier über die Inhaltsstoffe der großen, grünen Sorte berichten. Erstere hat Zwiebeln mit einem Durchschnittsgewicht von 30–110 g, während unser Material Werte von 250–700 g aufwies. Ob es sich bei beiden Formen um echte Varietäten oder nur um standort-bedingte Spielarten der gleichen Pflanze handelt, sei dahingestellt; auch Katz ließ diese Frage in seiner Arbeit offen^{1,2)}.

Es sei schon jetzt vorausgeschickt, daß wir in unseren Zwiebeln, obwohl wir uns des gleichen Aufarbeitungsweges wie Katz bedienten, keines der Bovoside A, B und C auffinden konnten. Während aus den kleinen, weißen Zwiebeln nach Katz die Kristallisation der Glykoside verhältnismäßig leicht gelingt, war in unserem Fall nach der Selbstfermentation eine recht umständliche Fraktionierung notwendig, um kristallisierte Verbindungen zu erhalten. Die Fermentation wurde durchgeführt, um möglichst die Glykoside auf der Monosid-Stufe zu untersuchen, da hierbei eher kristallisierbare Glykoside zu gewinnen sind. Bemerkenswert ist besonders, daß neben einem Glykosid zwei kristallisierte Aglykone aufgefunden wurden; jedenfalls ließ sich bei ihnen nach der Hydrolyse kein Spaltzucker auffinden. Ob diese Genine frei in den Zwiebeln vorkommen oder erst bei der Fermentation entstanden sind, muß vorerst dahingestellt bleiben. Ein Teil unserer Zwiebeln (1.2 kg) wurden im Botanischen Institut der Universität Hamburg einwandfrei als *Bowiea volubilis* H. (große, grüne Varietät) bestimmt und inmitten ihrer Vegetationsperiode verarbeitet. Eine zweite Menge (4.4 kg) wurde am Beginn des Austreibens untersucht. Es zeigten sich dabei Verschiebungen in der Menge der Glykosid-Fractionen, die auf das verschiedene Entwicklungsstadium der Pflanzen zurückgeführt werden können. Bei dem zuletzt genannten Material war der Gehalt des Chloroform-Äthanol(2:1)-Extraktes von 0.019 % auf 0.032 % erhöht. Die Schwierigkeit, zu kristallisierten Verbindungen zu gelangen, war in beiden Fällen die gleiche.

Bovosid D wurde aus dem Chloroformextrakt durch Chromatographie an Aluminiumoxyd gewonnen. Die Ausbeute war 0.0025 % der Zwiebeln. Es zeigte den Schmp. 288–296° und $[\alpha]_D^{15} : -67.5^\circ$. Die Analyse ist am besten mit einer Summenformel $C_{31}H_{44}O_{10}$ zu vereinen. Das UV-Spektrum wies ein Maximum bei 300 m μ mit einem log ϵ -Wert von 3.78 auf (Abbild. 1). Das neue Glykosid gehört also dem gleichen Typ wie die Bovoside von Katz an. Für die letale Dosis an der Katze fand Chen den Wert 0.1118 ± 0.0082 mg/kg³⁾. Nach diesen Befunden scheint das neue Glykosid mit keinem der früher gefundenen Bovoside identisch zu sein. Wir haben ihm daher die Bezeichnung Bovosid D zuerteilt.

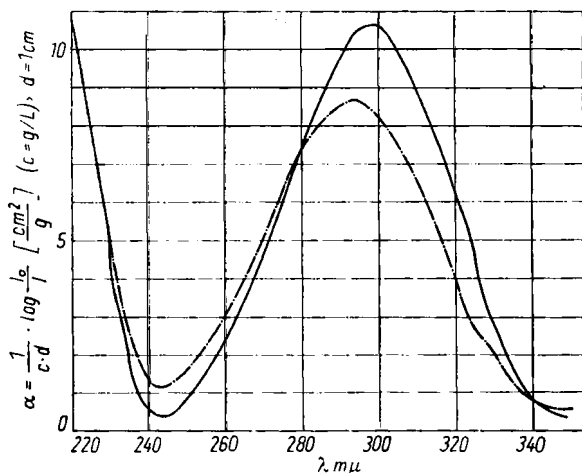
Bei der Hydrolyse lieferte Bovosid D Thevetose, die papierchromatographisch identifiziert wurde. Ein Vergleichspräparat dieses Zuckers, das uns

²⁾ Durch Hrn. Prof. T. Reichstein erhielten wir Kenntnis von der Ansicht Dr. P. Evans, Transvaal, daß es sich bei den obigen Varietäten lediglich um Altersunterschiede handelt.

³⁾ Wir möchten Hrn. Dr. K. K. Chen, Indianapolis, Ind., USA, auch hier unseren Dank aussprechen, sowohl für die Beschaffung der Zwiebeln von *B. volubilis* H., wie auch für die Toxizitätsbestimmung an der Katze.

liebenswürdigerweise Herr Prof. Reichstein, Basel, überließ⁴⁾, zeigte den gleichen R_F -Wert nach der Sichtbarmachung mit phthalsäurem Anilin. Ob *d*- oder *l*-Thevetose vorliegt, müssen weitere Untersuchungen mit größeren Mengen Material zeigen. Bei der Spaltung des Bovosids D nach Mannich mit Aceton-Salzsäure wurden neben unverändertem Glykosid im Geninanteil 2–3 Komponenten gefunden, von denen eine oder u.U. beide durch Anhydrierung des ursprünglichen Aglykons entstanden sein können. Keine von ihnen kristallisierte und zeigte eine Farbreaktion, die es gestatten würde, das Aglykon des Bovosids D dem Hellebrigenin zuzuordnen, mit dem es in der Summenformel übereinstimmt. Im Gegensatz zu ihm zeigen die Spaltprodukte des Bovosids D mit Schwefelsäure eine tiefrote Färbung, die darauf hindeuten könnte, daß im Bovogenin D vielleicht an C¹⁶ eine Oxygruppe steht. Hellebrigenin zeigte unter den gleichen Bedingungen nach 30 Min. nur eine Gelbfärbung.

Aus dem Chloroform-Äthanol(2:1)-Extrakt wurde in einer Ausbeute von 0.00045% ein Aglykon isoliert, dem wir die Bezeichnung Bovogenin E geben wollen; es zeigte den Schmp. 277–280° (Zers.) und $[\alpha]_D^{20} : +28^\circ$. Bei der Hydrolyse mit Säure ließ sich kein Zucker als Spaltprodukt auffinden. Nach der Analyse müßte die Verbindung die Zusammensetzung $C_{24}H_{34}O_9$ haben, wäre also damit das sauerstoffreichste Aglykon, das bisher aufgefunden worden ist. Ein möglicherweise in ihm enthaltener Acetylgehalt würde sich in der C,H-Analyse kaum bemerkbar machen; er konnte aus Materialmangel nicht bestimmt werden. Nach der UV-Absorption (Abbild. 1) gehört das



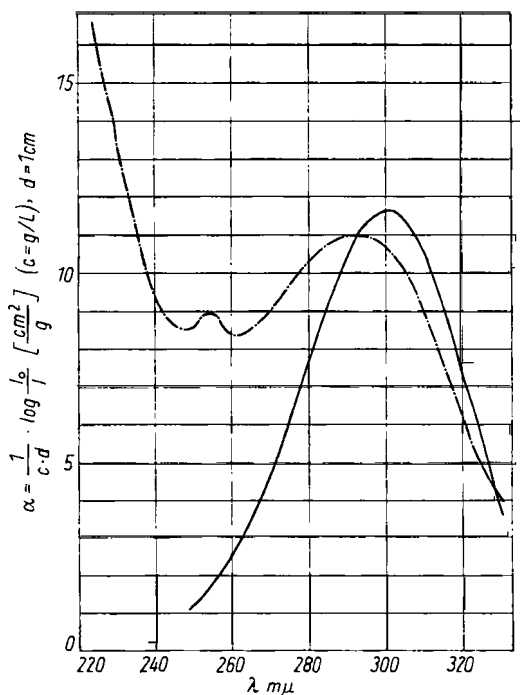
Abbild. 1. UV-Spektren von Bovosid D ($c = 0.05075$ g/l) — und Bovogenin E ($c = 0.0465$ g/l) - - - -; Lösungsmittel Methanol

Bovogenin E ebenfalls dem Scilla-Typ an: das Maximum lag bei 295 mμ, $\log \varepsilon = 3.70$. Dieser $\log \varepsilon$ -Wert wäre für ein Aglykon $C_{24}H_{34}O_9$ zu hoch, er müßte dort in der Gegend von 3.63 liegen, dagegen würde sich für ein Monoacetat der Wert 3.67 und für das Diacetat der obige Wert von 3.70 ergeben.

⁴⁾ Hrn. Prof. Dr. Reichstein sei auch hier für die Überlassung des Vergleichspräparates von Thevetose gedankt.

Diese Frage bedarf weiterer Prüfung; insbesondere muß mit einer größeren Materialmenge das Verhalten bei der Zuckerspaltung gründlicher untersucht werden, als es bisher möglich war.

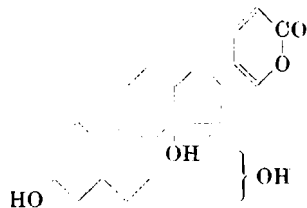
Schließlich fanden wir im Ätherextrakt noch ein Aglykon $C_{24}H_{34}O_5$ vom Schmp. 230–235° und $[\alpha]_D^{15} : +12.2^\circ$, das wir mit Kilimandscharogenin A bezeichnen wollen, da wir die gleiche Verbindung auch aus *B. kilimandscharica* Mildbread isolieren konnten. Die Ausbeute betrug 0.00007 % der Zwiebeln.



Abbild. 2. UV-Spektren von Kilimandscharogenin A ($c = 0.0436 \text{ g/l}$) ——— und Kilimandscharogenin B ($c = 0.0288 \text{ g/l}$) - - - -; Lösungsmittel Methanol

Nach dem Erwärmen mit Säure ließ sich ebenfalls kein Spaltzucker auffinden. Das UV-Spektrum (s. Abbild. 2) zeigte ein Maximum bei 300 mμ, $\log \epsilon = 3.69$. Auch hier liegt also der Typ vor, der im Aglykon 24 C-Atome mit einem doppelt ungesättigten Sechsring enthält. Für diese Verbindung käme eine Konstitutionsformel wie die nebenstehende in Frage.

Neben den kristallisiert erhaltenen Verbindungen ließen sich papierchromatographisch noch eine Reihe weiterer Glykoside oder Aglykone in dem Extrakt aus *Bowiea volubilis* H. nachweisen, und zwar im Ätherextrakt eine und im Chloroform-Äthanol (2:1)-Extrakt drei, die aber bisher nicht getrennt und kristallisiert werden konnten. Ihre Reindarstellung muß mit größeren Materialmengen erneut versucht werden.



Bowiea kilimandscharica Mildbread

Diese *Bowiea*-Art verdanken wir der freundlichen Vermittlung von Herrn Dozent Dr. Haul, Pretoria, der uns 12.5 kg von *B. kilimandscharica* M. aus Südafrika vermittelte⁵⁾. Die Zwiebeln hatten einen Durchmesser von 1–3 cm, nur wenige erreichten 3–5 cm. Sie wurden wahrscheinlich am Ende ihrer Vegetationsperiode verarbeitet. Der Gehalt dieser Zwiebeln an herzwirksamen Verbindungen war wesentlich kleiner als der in der vorstehend beschriebenen Art. Dafür enthielten die Zwiebeln größere Mengen eines fetten Öles, das etwa 0.34 % des Gewichtes ausmachte und in *B. volubilis* H. nicht beobachtet wurde.

Aus dem Ätherextrakt nach der Selbstfermentierung konnte ebenfalls Kilimandscharogenin A isoliert werden; es wurde mit dem aus *B. volubilis* H. identisch befunden. Die Ausbeute betrug 0.00012 % der frischen Zwiebeln. Daneben fand sich noch eine weitere Verbindung, die bei 200–230° schmolz und sich papierchromatographisch als nicht einheitlich erwies. Bei der Acetylierung und nach der chromatographischen Trennung an Aluminiumoxyd wurden zwei kristallisierte Acetate erhalten, von denen das eine nach dem UV-Spektrum nicht zur Gruppe der Herzgifte von C₂₄-Typ gehörte; das zweite schmolz bei 180–186°. Dieser Schmelzpunkt würde mit dem des Bufotalien-monoacetats übereinstimmen⁶⁾, auch das Spektrum wäre damit in Einklang. Ob eine Identität vorliegt, müssen weitere Versuche zeigen⁷⁾.

Aus dem Chloroformextrakt konnte ein weiteres Aglykon Kilimandscharogenin B der möglichen Zusammensetzung C₂₄H₃₄O₉ in einer Ausbeute von 0.00011 % kristallisiert erhalten werden, das also ebenfalls sehr sauerstoffreich ist. Leider reichte auch hier das Material nicht für eine Acetyl-Bestimmung aus. Bemerkenswert ist das UV-Spektrum, das im Gegensatz zu den Spektren der anderen Verbindungen dieses Typs neben dem Maximum bei 295 m μ ein weiteres bei 255 m μ aufwies. Es scheint in dem Molekül neben dem doppelt ungesättigten Lacton-Sechsring, der bei etwa 300 m μ absorbiert, noch ein weiteres ungesättigtes System vorhanden zu sein, für das die Anordnung eines Diens mit konjugierten Doppelbindungen oder eines α,β -ungesättigten Ketons in Frage käme. Auch beim Kilimandscharogenin B würde der log ϵ -Wert besser für ein Diacetat, für das sich der Wert 3.78 errechnen würde (gef. 3.78), als für ein freies Genin stimmen (ber. 3.71; für ein Monoacetat errechnet sich der Wert 3.75). Für das Maximum bei 255 m μ ergeben sich die Zahlen: Genin: log ϵ = 3.61, Monoacetat: log ϵ = 3.65, Diacetat: log ϵ = 3.69; gefunden wurde 3.69. Es gilt hier in Bezug auf die Zuckerspaltung das gleiche wie das beim Bovogenin E Gesagte.

⁵⁾ Wir möchten auch hier Hrn. Dr. Haul vielmals für seine Hilfe danken. Die Zwiebeln stammten von dem Züchter E. Rehm in Pretoria.

⁶⁾ H. Wieland u. R. Alles, Ber. dtsch. chem. Ges. 55, 1789 [1922]; K. Meyer, Helv. chim. Acta 32, 1993 [1949].

⁷⁾ Inzwischen war Hr. Dr. K. Meyer, Basel, so freundlich, unser Präparat mit Bufotalien-monoacetat zu vergleichen; die beiden Verbindungen waren nicht identisch. Es sei Hrn. Dr. Meyer auch an dieser Stelle vielmals für diese Prüfung gedankt.

Daneben enthält die Zwiebel nach der papierchromatographischen Untersuchung vermutlich noch bis zu drei weitere Glykoside bzw. Aglykone, wobei Thevetose als Spaltzucker nachgewiesen werden konnte. Auch hier reichte die Menge für eine Isolierung nicht aus.

Für die Sichtbarmachung der Aglykone und Glykoside des C_{24} -Typs bei der Papierchromatographie haben wir uns der Papiersorte 2043a der Firma Schleicher und Schüll bedient, die ein Arbeiten mit konz. Schwefelsäure ohne wesentliche Verfärbung des Papiers gestattet. Mit diesem Reagens geben die Verbindungen dieses Typs im allgemeinen auf dem Papier charakteristische Färbungen, so daß die Laufstrecke gut bestimmt werden kann. Ferner erlauben die unterschiedlichen Farben eine weitere Zuordnung der geprüften Stoffe. In der Regel sind so noch mit 10 γ Farbflecke zu erzielen. Dieses Verfahren wurde zuerst von Zaffaroni, Reich und Nelson⁸⁾ bei Steroiden angewandt und von uns auf die Herzgifte des C_{24} -Typs übertragen. Ein Versuch, die in der Handhabung etwas unbequeme konz. Schwefelsäure nach dem Vorschlag von R. Neher und A. Wettstein⁹⁾ durch 15-proz. Phosphorsäure zu ersetzen, erwies sich hier als nicht glücklich, da die Empfindlichkeit der Farbreaktion erheblich nachließ, auch wenn nachher die Färbung im Ultraviolett untersucht wurde. Auch mit Formamid getränktes Papier kann für das Schwefelsäure-Verfahren herangezogen werden, wobei allerdings zu beachten ist, daß die Farberscheinungen schneller ablaufen und u.U. etwas anders ausfallen; auch bleibt die Empfindlichkeit nicht ganz die gleiche. Es wurde auf dem mit Formamid getränkten Papier nach der von Zaffaroni¹⁰⁾ angegebenen Durchlaufmethode gearbeitet, bei der das Lösungsmittel unten abtropft und die in gleichen Zeiten zurückgelegten Wegstrecken für die geprüften Stoffe bestimmt werden.

Wir danken der Joachim-Jungius-Gesellschaft der Wissenschaften in Hamburg für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Bowiea volubilis H.

4.4 kg frische Zwiebeln von *Bowiea volubilis* H. wurden zerschnitten und im Fleischwolf zerkleinert. Die schleimige Masse wurde nach Zusatz von 50 ccm Toluol 72 Std. bei 37° gehalten. Danach wurde sie durch ein Tuch abgepreßt; die Rückstände wurden 3 mal mit 750 ccm Methanol ausgekocht. Die vereinigten Extrakte (etwa 7 l) wurden mit aus 1 kg Bleiacetat hergestelltem frisch gefälltem Bleihydroxyd $\frac{1}{2}$ Stde. geschüttelt. Nach der Filtration durch Kieselgur wurde das in Lösung gegangene Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt. Die hellgelbe, klare Lösung wurde durch Zugabe von Essigsäure auf p_H 7 eingestellt und i. Vak. bei 30° auf 500 ccm eingeeengt. Die leicht sirupöse Lösung wurde mit 500 ccm Chloroform-Äthanol (2:1) extrahiert und dann noch viermal mit 200 ccm der schweren Phase eines Äthanol-Chloroform-Wasser-Gemisches (d 1.37). Die vereinigten Auszüge wurden i. Vak. bei 30° eingedampft und der Rückstand mit 15 ccm Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde mit Wasser auf 150 ccm aufgefüllt, fünfmal mit je 250 ccm Äther extrahiert und der Extrakt mit Wasser und nNa_2CO_3 gewaschen. Anschließend wurde die wäßr. Phase fünfmal mit je 250 ccm Chloroform extrahiert und der Extrakt ebenfalls wie üblich gewaschen. Dann erfolgte eine Extraktion mit 250 ccm Chloroform-Äthanol (2:1) und anschließend mit der schweren Phase des oben erwähnten Chloroform-Äthanol-Wasser-Gemisches. Der Äther-, Chloroform- und Chloroform-Äthanol-Extrakt wurde jeder für sich mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. verdampft. Es ergaben sich 1.684 g Äther-, 1.122 g Chloroform- und 1.397 g Chloroform-Äthanol-Extrakt.

⁸⁾ A. Zaffaroni, H. Reich u. D. H. Nelson, J. biol. Chemistry 187, 414 [1950].

⁹⁾ Helv. chim. Acta 34, 2278 [1951].

¹⁰⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton u. E. H. Kentmann, J. biol. Chemistry 177, 109 [1949].

Aufarbeitung des Ätherextraktes; Isolierung von Kilimandscharogenin A

1.836 g Ätherextrakt wurden in 125 ccm Chloroform-Äther (3:2) an einer Säule von 40 g Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufe II, die mit Äther bereitet worden war, nach dem Durchlaufverfahren chromatographiert. Zunächst wurde mit Äther, dann mit Äther-Chloroform (1:1), weiter mit Chloroform und dann mit Chloroform mit steigendem Methanolzusatz (1, 2, 4, 8% u. mehr bis 50%) eluiert. Mit reinem Chloroform ließ sich von der Säule eine Substanz ablösen, die im UV bei 300 m μ ein Maximum zeigte. Auch die folgenden Fraktionen, die mit Chloroform + 1% Methanol erhalten wurden, zeigten diese UV-Absorption. Nur aus einer dieser letztgenannten Fraktionen ließen sich Kristalle aus Essigester gewinnen. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton schmolzen sie bei 230–235°; Ausb. 4 mg, $[\alpha]_D^{25}$: +12.2° \pm 6° (c = 0.985, Methanol).

Die Färbung mit konz. Schwefelsäure war gelb (3 Min.), gelbgrün (10 Min.), gelboliv (1 Stde.), oliv (2 Stdn.), grauviolett (3 Stdn.), grünblau (4 Stdn.). Die Färbungen mit 84-proz. Säure braunrot (3 Min.), braun (10 Min.), schmutzigbraun (1 Stde.), schmutzigblau (2 Stdn.), blaulila (3 Stdn.).

Der Misch-Schmelzpunkt mit Kilimandscharogenin A aus *B. kilimandscharica* M. (s.d.) zeigte keine Erniedrigung. Das Durchlaufchromatogramm auf mit Formamid getränktem Papier und mit Benzol-Chloroform (2:1) als Lösungsmittel ergab nach 14 Stdn. eine Laufstrecke von 40 cm bei beiden Proben in entsprechender Weise und mit identischen Färbungen.

Die Versuche, durch Gegenstromverteilung über 20 Stufen, durch Verteilungschromatographie an Silicagel, oder nach Acetylierung durch Chromatographie an Aluminiumoxyd weitere kristallisierte Anteile aus dem Ätherextrakt zu gewinnen, verliefen erfolglos. Die Papierchromatographie machte wahrscheinlich, daß wenigstens noch eine weitere Verbindung vom C₂₄-Typ vorhanden sein muß.

Bei der Papierchromatographie wurden die Filtrierpapierstreifen unmittelbar vor der Benutzung durch Formamid gezogen und zwischen Filtrierpapier abgepreßt. Dann wurden 20 γ Substanz am Startpunkt in Chloroform-Lösung aufgetragen. Das zur Entwicklung vorgesehene Lösungsmittelgemisch wurde mit Formamid, die Atmosphäre im Entwicklungsgefäß mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch gesättigt. Nach Beendigung der Entwicklung wurde das Papier zunächst wie üblich und anschließend bei 100° getrocknet. Auf eine gute Trocknung ist besonders zu achten. Die Streifen wurden dann auf einer Glasplatte mit weißer Unterlage ausgebreitet und mit einem Glasstab möglichst schnell und gleichmäßig mit konz. Schwefelsäure befeuchtet; die Flecke erschienen sofort. Nach 10–15 Min. ist die Auflösung des Papiers meist so weit fortgeschritten, daß die Flecken nicht mehr unterschieden werden können. Wird dagegen mit nicht mit Formamid getränktem Papier gearbeitet, so schreitet die Hydrolyse des Papiers langsamer voran, und man kann die Farbflecke zuweilen noch nach 1–1½ Stdn. beobachten. In vielen Fällen ist jedoch die Färbung inzwischen weitgehend verblaßt.

Aufarbeitung des Chloroformextraktes; Isolierung von Bovosid D

1.3 g Chloroformextrakt wurden in 100 ccm Chloroform gelöst und an einer Säule von 55 g Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufe II chromatographisch zerlegt. Es wurde zunächst mit Chloroform, dann mit Chloroform mit 1, 2, 4 und 20% Methanolzusatz eluiert. Aus mehreren der Fraktionen mit 4 und 8% Methanol-Zusatz ließen sich auf folgendem Wege Kristalle erhalten: das ölige Eluat wurde in Chloroform + 10% Methanol gelöst und die Lösung mit 10 ccm Wasser versetzt. An der Grenzschicht der beiden sich ausbildenden Phasen erschienen nach einigen Tagen Nadelchen in einer Menge von 20 mg, die sich als Bovogenin E erwiesen (s.d.).

An Bovosid D konnten aus den mittleren Fraktionen der Elution mit Chloroform + 2% Methanol nach Eindampfen und Aufnehmen in Methanol 220 mg Rohkristallisiert gewonnen werden. Die Kristalle schmolzen nach 5maligem Umkristallisieren bei 288 bis 290° (Zers.); hexagonale Blättchen von $[\alpha]_D^{25}$: –67.5° (c = 1.086, Methanol).

C₃₁H₄₄O₁₀ (576.7) Ber. C 64.56 H 7.69 OCH₃ 5.38 Gef. C 64.64 H 7.63 OCH₃ 5.88

Acetylgruppen ließen sich in dem Glykosid nicht feststellen. Färbung mit konz. Schwefelsäure: zitronengelb (0 Min.), indischgelb (3 Min.), braun (30 Min.), braunrot (1 Stde.), kirschrot (3 Stdn.); in 84-proz. Säure entsprechend, nur nach (3 Stdn.) karmoisinrot, später ebenfalls kirschrot.

R_F-Wert in Aceton + Wasser (3 : 7) 0.87 bei 20°, Färbung gelb (0 Min.), dann rot (10 Min.).

Mit 17 mg Bovosid D wurde eine Spaltung nach Mannich mit 10 ccm Aceton und 0.1 ccm konz. Salzsäure über 16 Tage durchgeführt. Nach der üblichen Aufarbeitung wurden aus dem Chloroformextrakt 7 mg Bovosid D zurückgewonnen. Die Mutterlaugen der Kristalle wurden an 0.5 g Aluminiumoxyd (Aktivitätsstufe II) chromatographiert. Es wurden 2 Fraktionen erhalten (mit Chloroform und mit Chloroform + 2% Methanol), von denen keine kristallisierte, auch nicht nach Acetylierung und erneutem Chromatographieren der Acetate.

In der wäßr. Phase der Mannich-Spaltung wurde nach Nachhydrolyse der Zucker in der üblichen Weise papierchromatographisch bestimmt (Lösungsmittel Butanol-Eisessig-Wasser, 4 : 1 : 5). Der Zucker wurde auf dem Papier mit phthalsäurem Anilin sichtbar gemacht. R_F-Wert 0.64; den gleichen Wert und eine entsprechende Färbung lieferte Thevetose, die zur Kontrolle mit entwickelt wurde.

Aufarbeitung des Chloroform-Äthanol-Extraktes; Isolierung von Bovogenin E

1.397 g Rückstand dieses Extraktes wurden in 50 ccm einer Mischung Chloroform-Methanol (9 : 1) gelöst und an einer mit Chloroform eingeschlammten Säule aus 40 g Aluminiumoxyd (Aktivitätsstufe II) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit Chloroform, dem steigende Mengen Methanol zugefügt wurden. Die Fraktionen, die mit Chloroform + 4% Methanol aus der Säule erschienen und die ein Absorptionsmaximum bei 295–300 m μ aufwiesen, wurden vereinigt und eingedampft. Der Rückstand wurde wieder in 5 ccm Methanol gelöst, die Lösung mit 45 ccm Chloroform versetzt und die Mischung mit 10 ccm Wasser durchgeschüttelt. Nach einigen Tagen zeigten sich an der Grenzschicht der Phasen kleine Nadelchen, die denen entsprachen, die auf die gleiche Weise aus dem Chloroformextrakt erhalten worden waren.

Die Kristalle des Bovogenins E wurden 4mal aus Methanol unkristallisiert und schmolzen danach bei 277–280°. Ausb. 25 mg; $[\alpha]_D^{20}$: +28° \pm 6° (c=0.50, Methanol). Beim Trocknen der Analysesubstanz i. Hochvak. bei 100° trat ein Verlust von 6.15% auf, ein Betrag, der mit dem Verlust von 2 Moll. Wasser oder 1 Mol. Methanol vereinbar wäre.

C₂₄H₃₄O₉ (466.5) Ber. C 61.79 H 7.35

C₂₆H₃₆O₁₀ (508.6) Ber. C 61.40 H 7.14 (1 Acetyl)

C₂₈H₃₈O₁₁ (550.9) Ber. C 61.09 H 6.91 (2 Acetyle) Gef. C 61.54 H 6.99

Färbungen mit konz. Schwefelsäure: orange (0 Min.), karmoisin (3 Min.), bordeauxrot (30 Min.), braunviolett (3 Stdn.); mit 84-proz. Säure waren die Färbungen ähnlich. R_F-Wert in Aceton-Wasser (3 : 7) bei 20° 0.94; Färbung rot (0 Min.).

Ein 3 stdg. Kochen mit *n* methanol. HCl und Nachhydrolyse von ½ Stde. mit wäßr. *n* HCl lieferte keinen Zucker. Auch der Versuch einer Hydrolyse unter milderen Bedingungen mit *n*/₂₀ H₂SO₄ (½ Stde. bei Siedetemperatur) lieferte das gleiche Ergebnis. In beiden Fällen färbte sich der Spaltansatz schwarzbraun bis braun. Die Keller-Kiliani-Reaktion mit der Substanz war negativ.

Die weiteren Fraktionen der Chromatographie nach Entfernung des Bovogenins E ergaben bisher keine weiteren Kristallise, obwohl durch Gegenstromverteilung sowie Acetylierung und erneute Chromatographie an Aluminiumoxyd eine Auftrennung des Gemisches versucht wurde. Auch nach Entacetylierung der erhaltenen Fraktionen und durch erneute Benzoylierung waren keine Kristallise zu erhalten. Nach dem Papierchromatogramm sind noch bis zu 3 weitere Verbindungen nicht glykosidischer Art vom C₂₄-Typ zu erwarten.

Bowiea kilimandscharica Mildbread

12.5 kg Zwiebeln von *B. kilimandscharica* M. wurden in gleicher Weise, wie bei *B. volubilis* H. beschrieben, verarbeitet. Die Reizwirkung auf die Haut ist hier wesentlich stärker als bei *B. volubilis* H. Es wurden 4.34 g Ätherextrakt, 1.92 g Chloroformextrakt und 2.66 g Chloroform-Ät¹anol(2:1)-Extrakt gewonnen.

Die chromatographische Behandlung des Ätherextraktes, gelöst in 150 ccm Äther an einer Säule von 150 g Aluminiumoxyd (Aktivitätsstufe II), ergab aus 2 Fraktionen des Eluates (Chloroform + 1% Methanol) 50 mg Rohkristallisat.

Kilimandscharogenin A

Das Rohkristallisat wurde sechsmal aus Aceton umkristallisiert. Die am schwersten lösliche Fraktion (6 mg) lieferte große Nadeln, die bei 135° opak wurden und dann bei 245–252° schmolzen. Aus den Mutterlaugen konnten noch weitere 9 mg isoliert werden, die den etwas tieferen Schmp. 230–252° aufwiesen. Im Papierchromatogramm erwiesen sie sich als identisch. In Benzol-Chloroform (2:1) ergaben sie in 12 Stdn. eine Wegstrecke von 25 cm; $[\alpha]_D^{20}$: +11.2° ± 2° (c=1.07, Aceton). Beim Trocknen vor der Analyse trat ein Verlust von 1 Mol. H₂O = 4.27% auf.

C₂₄H₃₄O₈ (402.5) Ber. C 71.61 H 8.51 Gef. C 71.66 H 8.50

Färbungen mit konz. Schwefelsäure: gelbbraun (1 Min.), gelbgrün (3 Min.), gelboliv (10 Min.), gelbbraun (1 Stde.), braunviolett (2 Stdn.), grauviolett (3 Stdn.) und grünblau (4 Stdn.); mit 84-proz. Säure wandelte sich die Färbung über gelbbraun, braunrot, braun, schmutziggelb, schmutzigblau nach blaulila.

Ein Versuch der Hydrolyse mit Säure unter den beim Bovogenin E angegebenen Bedingungen lieferte keinen nachweisbaren Zucker.

Die Mutterlaugen von Kilimandscharogenin A ergaben noch 4–5 mg eines Kristallisats vom Schmp. 200–230°. Sie wurden mit den übrigen Mutterlaugen vereinigt und in üblicher Weise acetyliert (Pyridin + Essigsäureanhydrid). Bei der Chromatographie an Aluminiumoxyd nach dem Durchlaufverfahren wurden aus einer mit Chloroform + 1% Methanol aus der Säule gewonnenen Fraktion 1.5 mg Kristalle vom Schmp. 180–186° erhalten.

Kilimandscharogenin B

Diese Verbindung wurde durch Chromatographieren des Chloroformextraktes (1.92 g in 25 ccm Chloroform) an 75 g Aluminiumoxyd (Aktivitätsstufe II) erhalten. Sie fand sich in den Fraktionen, die mit Chloroform + 2% Methanol aus der Säule erschienen. Es wurden 90 mg Rohkristallisat gewonnen, die aus Aceton nach 6maligem Umkristallisieren 14 mg Prismen ergaben. Schmp. 266–269°; $[\alpha]_D^{20}$: +79.6° ± 10° (c=0.793, Pyridin).

C₂₄H₃₄O₉ (466.5) Ber. C 61.79 H 7.35

C₂₄H₃₆O₉ (462.5) Ber. C 62.32 H 6.54 (2 Doppelbindd.) Gef. C 61.61 H 6.75

C₂₆H₃₂O₁₀ (504.5) Ber. C 61.89 H 6.39 (1 Acetyl)

C₂₆H₃₄O₁₁ (546.6) Ber. C 61.54 H 6.23 (2 Acetyle)

Der Wasserverlust beim Trocknen betrug 2%; diese Menge würde mit der Abgabe von 1 H₂O in Einklang stehen.

Färbungen mit konz. Schwefelsäure: gelbbraun (1 Min.), braunrot (3 Min.), rotbraun (10 Min.), rot (1 Stde.), rosa (3 Stdn.), schwachrosa (4 Stdn.). Ähnlich verliefen die Färbungen mit 84-proz. Säure. Bei der Hydrolyse mit Säure ließ sich kein Spaltzucker auffinden.

Durch Acetylierung und Chromatographie an Aluminiumoxyd ließen sich aus den Mutterlaugen von Kilimandscharogenin B keine weiteren Kristallisate gewinnen. Auch die Entacetylierung der erhaltenen einzelnen Fraktionen führte zu keinem Ergebnis. Der Chloroform-Äthanol-Extrakt enthielt nach dem UV-Spektrum keine nennenswerten Mengen von Verbindungen des C₂₄-Typs mehr.