

Literatur²²) angegebenen Schmp. von 195°; Mischprobe des Aldehyds sowie seines nach W. J. Boyd und W. Robson¹²) dargestellten Anils vom Schmp. 128–129°²³) mit authentischen²⁴) Präparaten ergaben keine Schmp.-Erniedrigungen.

b) aus II läßt sich der Indolaldehyd-(3) in der gleichen Weise gewinnen, wenn man das Hydroxylamin II in Äthanol löst und wie unter a) beschrieben durch Oxydation mit Nitrobenzol und Alkali weiterverarbeitet; Ausbeute wie unter a).

c) Zur Darstellung des Indolaldehyds-(3) aus III braucht man das Nitron nur in wäbr.-alkohol.-alkal. Lösung mit Wasserdampf zu destillieren und die im Destillierkolben verbleibende alkalische Lösung anzusäuern; Ausb. 93% d. Theorie.

Phenyl-skatyl-amin

a) aus Indolaldehyd-(3)-anil: 1.1 g des reinen Anils¹²) wurden in 25 ccm absol. Äther gelöst, langsam mit 10 ccm 1 m äther. Lithiumaluminiumhydrid-Lösung versetzt und 1 Stde. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde mit feuchtem Äther hydrolysiert und das Aluminiumhydroxyd mit 10-proz. Natronlauge gelöst; dann wurde ausgeäthert. Als Ätherrückstand verblieben 1.1 g farbloser Kristalle vom Schmp. 94–96° (Sintern ab 91°). Aus Cyclohexan farblose, glänzende Blättchen vom Schmp. 95–96°; Reinausbeute über 85% d. Theorie.

$C_{15}H_{14}N_2$ (222.3) Ber. C 81.04 H 6.35 N 12.60 Gef. C 81.00 H 6.35 N 12.82

Die Substanz wird von Säure unter Bildung amorpher Produkte zersetzt.

b) aus II: Die Lösung von 1.19 g des reinen Hydroxylamins II in 25 ccm absol. Äther wurde mit 10 ccm 1 m äther. $LiAlH_4$ -Lösung versetzt, 1 Stde. unter Rückfluß gekocht und wie unter a) aufgearbeitet. Als Ätherrückstand wurden 1.17 g eines schwach gelblichen Öls erhalten, das beim Anreiben mit Benzol/Cyclohexan 0.97 g farbloser Kristalle vom Schmp. 65–73° lieferte; die Umkristallisation aus 95-proz. wäbr. Methanol ergab eine Substanz vom Schmp. 95–96°, die mit dem aus Indolaldehyd-(3)-anil und $LiAlH_4$ erhaltenen Phenyl-skatyl-amin identisch war (Mischprobe).

82. Friedhelm Korte: Über neue glykosidische Pflanzeninhaltsstoffe, II. Mitteil.*): Zur Konstitution des Gentiopikrins

[Aus der Biochem. Abteilung des Chemischen Staatsinstitutes der Universität Hamburg]
(Eingegangen am 15. Februar 1954)

Für das Gentiopikrin, den Bitterstoff aus *Gentiana lutea*, wird die Konstitutionsformel eines Glucosyloxy-2-oxo-6-isopropenyl-2.7a-dihydro-6H-furano-(2.3-b)-pyrans vorgeschlagen. Die Glucosyl-oxy-Gruppe ist wahrscheinlich in 3-Stellung mit dem Grundgerüst verknüpft**).

Das Gentiopikrin ist bereits 1862 durch A. Kromeyer¹) aus der frischen Enzianwurzel (*Gentiana lutea*) isoliert worden. H. Bourquelot und L. Hérissey²) und später G. Tanret³) verbesserten die Darstellungsmethoden und konnten zeigen, daß der Enzian-

²²) F. G. Hopkins u. S. W. Cole, J. Physiology **29**, 451 [1903].

²³) Boyd u. Robson¹²) geben einen Schmp. von 122.5°, R. Majima u. M. Kotake, Ber. dtsh. chem. Ges. **58**, 2037 [1925], von 126–127° an.

²⁴) Der zum Vergleich benötigte Indolaldehyd-(3) wurde nach J. Elks, D. F. Elliot u. B. A. Hems, J. chem. Soc. London **1944**, 629 gewonnen.

*) I. Mitteil.: F. Korte, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. **58**, 286, 295 [1953].

**) Herrn Dr. F. Richter vom Beilstein-Institut, Höchst, danke ich sehr herzlich für die korrekte Bezeichnung der Verbindung. ¹) Arch. Pharmaz. **110**, 27 [1862].

²) J. Chim. pharm. (6) **12**, 421 [1900].

³) G. Tanret, Bull. Soc. chim. France (3) **33**, 1059 [1905].

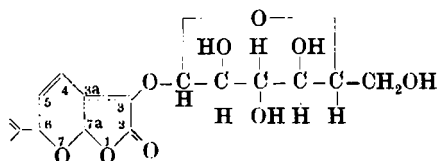
bitterstoff ein Glykosid mit Lactoncharakter ist. Erst 30 Jahre später erschienen 2 Arbeiten von Y. Asahina und Mitarbb.^{4, 5)}, die den ungesättigten Charakter des Gentiopikrins bewiesen. Sie zeigten ferner, daß das bei der Enzymspaltung entstehende Genin, das Mesogentiogenin, sich sehr leicht in das Eugentiogenin umlagert. Daneben entsteht aus dem Mesogentiogenin das dimere Gentiogenin, das von Tanret als das ursprüngliche Genin angesehen wurde. Asahina und Mitarbb. konnten jedoch keinen Einblick in die Konstitution gewinnen.

Das Gentiopikrin läßt sich aus frischen Gentianawurzeln nur schwierig mit etwa 1% Ausbeute isolieren. Wenn die Gesamtaufarbeitung länger als 3 Tage dauert, kann man nur noch ganz geringe Mengen des Bitterstoffes rein darstellen. Es empfiehlt sich daher, die Enzianwurzeln in Mengen von 1 bis 2 kg aufzuarbeiten. Dabei läßt sich mit einiger Übung die angegebene Ausbeute erzielen.

Nach genauer Kenntnis der Isolierungsmethoden wurde einmal die Aufarbeitung von 50 kg Enzianwurzeln in einem Ansatz versucht, wobei die Chemische Fabrik Promonta, Hamburg, so liebenswürdig war, sich dieses Problems in sorgsamster Weise anzunehmen⁶⁾; doch obwohl die Isolierung des Gentiopikrins unter denkbar schonenden Bedingungen innerhalb von zwei Tagen beendet war, sank die Ausbeute an reinem Gentiopikrin auf höchstens 0.1%.

Es gelingt nicht, das Gentiopikrin aus der getrockneten Wurzel zu isolieren. Nach Acetylierung und sorgsamer Chromatographie läßt sich jedoch das Gentiopikrin-acetat erhalten.

Zunächst wurde nun versucht, das Acetat in das Gentiopikrin (I) zu überführen, was sich aber wegen der außerordentlichen Empfindlichkeit des Gentiopikrins gegenüber Alkali als sehr schwierig erwies. So mißlang selbst das



I

Spaltungsverfahren nach T. Reichstein und Mitarbb.⁶⁾, die die Acetate der Herzgiftglykoside in guter Ausbeute in Methanol mit Natriumhydrogencarbonat verseifen. Die Verseifung nach G. Zemplén⁷⁾ mit Natriummethylat in absol. Alkohol ergab bei Zimmertemperatur ebenfalls kein Gentiopikrin; dieses konnte jedoch bei -10° in 8–12-proz. Ausbeute aus dem Tetraacetat isoliert werden.

Da sich die Ausbeute nicht erhöhen ließ, mußte wegen der Kostbarkeit des Materials ein anderer Weg zur Konstitutionsaufklärung benutzt werden. Bei der Hydrolyse mit Salzsäure erhielt man aus dem Gentiopikrin-tetraacetat ein Mol. Glucose und in einer Ausbeute von maximal 10% das bereits

⁴⁾ Y. Asahina, J. Asano, Y. Weno, Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 771 [1936].

⁵⁾ Y. Asahina u. Y. Sakurai, Ber. dtsch. chem. Ges. **72**, 1534 [1939].

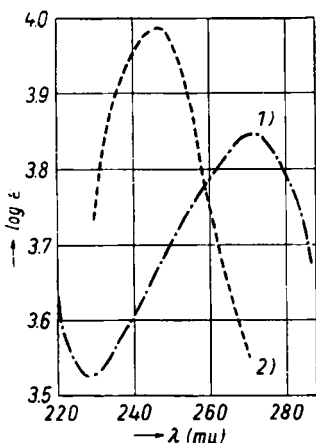
⁶⁾ Ich möchte an dieser Stelle Herrn Dr. Masch und Fräulein Dr. Huchting sehr herzlich für die freundliche Übernahme der Aufarbeitung danken.

⁶⁾ J. Schmutz u. T. Reichstein, Pharmac. Acta Helvetiae **22**, 369 [1947].

⁷⁾ G. Zemplén u. D. Kiss, Ber. dtsch. chem. Ges. **60**, 165 [1927].

von Tanret beschriebene Gentiogenin. Das monomere Genin des Gentiopikrins wurde unter diesen Bedingungen zerstört.

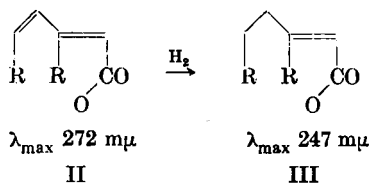
Einen Hinweis auf die Konstitution ergaben jedoch die Hydrierungsbefunde. Dabei zeigte sich, daß das Molekül 3 Doppelbindungen enthielt; 2 davon waren gleichwertig und innerhalb weniger Minuten auch mit Pd-Tierkohle hydrierbar. Die dritte Doppelbindung benötigte zur Absättigung 15–20 Std., was für eine α,β -ungesättigte Lacton- oder Ketoverbindung sprach. Ein Vergleich des UV-Spektrums des Gentiopikrin-acetats mit denen seiner Hydrierungsprodukte ergab nebenstehendes Bild (Abbild. 1): Das Gentiopikrinacetat zeigt eine Absorption bei 272 $m\mu$, was auf eine in Konjugation zum α,β -ungesättigten Lactonsystem stehende Doppelbindung hinweist⁸⁾. Das nach dem Absättigen zweier Doppelbindungen entstehende Tetrahydro-gentiopikrin-acetat zeigt dagegen eine Absorption bei 247 $m\mu$, was bedeutet, daß eine Doppelbindung, die in Konjugation zum α,β -ungesättigten Lactonsystem steht, hydriert worden ist, dagegen aber die zweite hydrierte Doppelbindung von vornherein isoliert gestanden hat.



Abbild. 1. UV-Spektren von: 1) Gentiopikrin-tetraacetat, $c = 0.0214$ g/l Methanol; $\log \epsilon = 3.84$, $\lambda_{\max} 272$ $m\mu$

2) α -Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetat, $c = 0.020$ g/l Methanol; $\log \epsilon = 3.98$, $\lambda_{\max} 247$ $m\mu$

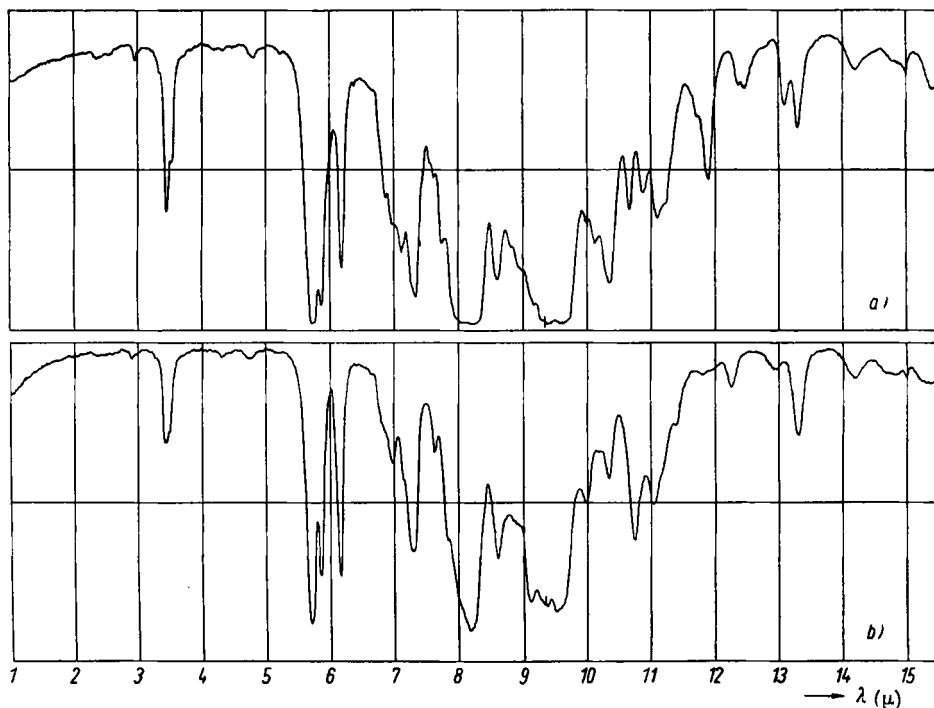
gentiopikrin-acetat zeigt dagegen eine Absorption bei 247 $m\mu$, was bedeutet, daß eine Doppelbindung, die in Konjugation zum α,β -ungesättigten Lactonsystem steht, hydriert worden ist, dagegen aber die zweite hydrierte Doppelbindung von vornherein isoliert gestanden hat.



Neben der schon von Asahina erhaltenen und von ihm als α -Tetrahydro-gentiopikrin bezeichneten Verbindung (Schmp. 208°) entsteht noch eine niedriger schmelzende (Schmp. 156°), die die gleiche Summenformel besitzt und von Asahina als β -Tetrahydro-gentiopikrin bezeichnet wurde, wobei die Verbindungen als Stereoisomere betrachtet wurden. Da jedoch das β -Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetat eine um 10 $m\mu$ nach kürzeren Wellenlängen verschobene Absorption zeigt ($\lambda_{\max} 237.5$, $\log \epsilon = 4.02$), war es schon deshalb unwahrscheinlich, daß es sich in diesem Fall um eine solche Isomerie

⁸⁾ F. Korte, Angew. Chem. 63, 370 [1951].

handelte. Das β -Tetrahydro-gentiopikrin-acetat nähert sich in seinem UV-Spektrum mehr dem enolisierten α -Keto- β -methyl- γ -butyrolacton, dessen Absorptionsmaximum bei 232 $m\mu$ liegt. In gleicher Weise ließen sich die UR-Spektren (Abbild. 2) deuten, die deutliche Strukturunterschiede ergaben⁺.



Abbild. 2. UR-Spektren (Präparate zwischen Natriumchloridplatten geschmolzen):
 a) α -Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetat
 b) β -Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetat

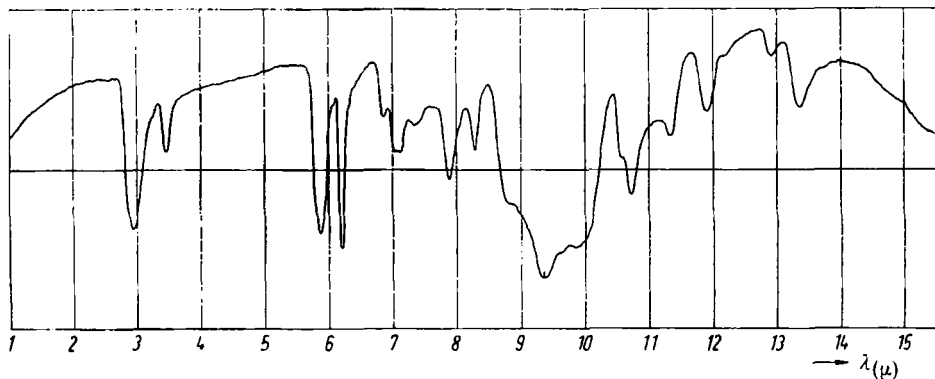
Der endgültige Beweis der strukturellen Verschiedenheit beider Substanzen ließ sich nun durch die Acetylierung erbringen. Acetyliert man das α - und das β -Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetat mit Acetanhydrid/Pyridin nach, so verändert sich nur die β -Verbindung. Sie zeigt einen höheren Schmelzpunkt, und die Acetylbestimmung ergibt bei Verseifung in saurem Medium etwa 5 an Stelle von vorher 4 Acetylresten. Die Konstitution dieses Hydrierungsproduktes ist noch unbekannt, und die Strukturaufklärung bedarf weiterer Arbeit. Entscheidend für die Problemstellung ist in diesem Sinne nur, daß es kein Stereoisomeres des Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetates ist, sondern sich strukturell von ihm unterscheidet.

Durch Auswahl der Lösungsmittel bei der Hydrierung läßt sich das Verhältnis der entstehenden Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetate variieren. In Eisessig mit Pd oder Pt entsteht überwiegend das hochschmelzende normale α -Tetrahydro-Produkt unter Auf-

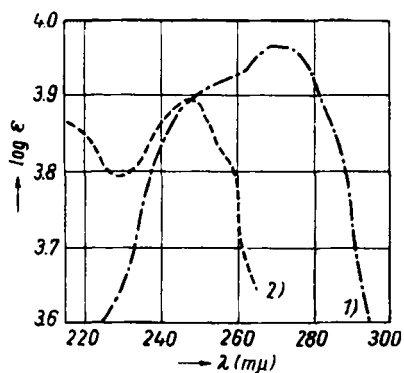
⁺ Für die Aufnahme und Diskussion aller UR-Spektren danke ich Herrn Prof. Dr. R. Mecke und Herrn Dr. W. Lüttke, Freiburg i. Br., auch an dieser Stelle besonders herzlich.

nahme von genau 2 Moll. Wasserstoff. Bei der Hydrierung in Essigester, oder, noch stärker, in wasserähnlichen Lösungsmitteln wie z.B. Dioxan und Methanol lassen sich bis zu 18% des niedrig schmelzenden β -Tetrahydro-gentiopikrin-acetates isolieren. Daneben treten aber immer ölige Zersetzungsprodukte auf.

Nach der Absättigung der dritten Doppelbindung zeigt das hydrierte Gentiopikrin-tetraacetat keine Absorption mehr oberhalb von 220 $m\mu$, abgesehen von der schwachen C=O-Bande. Die Stellung der hydrierbaren isolierten Doppelbindung ist durch Ozonisation zu erkennen. Beim Einleiten eines 10-proz. Ozonstromes in eine Lösung von Gentiopikrin-tetraacetat in Chloroform lassen sich neben Ameisensäure 0.9 Moll. Formaldehyd als Dimedonverbindung isolieren. Hierdurch ist die eine nicht konjugierte Doppelbindung als endständige Methylengruppe erkannt. Mit Hydroxylamin oder Semicarbazid reagiert das Tetrahydro-gentiopikrin-acetat nicht. Ebenso schlugen alle Versuche fehl, durch Oxydation mit Permanganat oder Chromsäure Abbauprodukte zu fassen, die einen deutlichen Hinweis auf die Konstitution zuließen.



Abbild. 3. UR-Spektrum von Gentiopikrin, zwischen Natriumchloridplatten geschmolzen



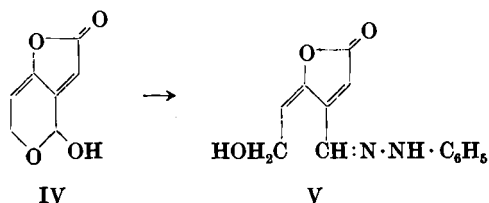
Abbild. 4. UV-Spektren von:

1. Gentiopikrin, $c = 0.0285$ g/l Methanol; $\log \epsilon = 3.96$, $\lambda_{\max} 270$ $m\mu$.
2. Tetrahydro-gentiopikrin, $c = 0.0214$ g/l Methanol; $\log \epsilon = 3.89$, $\lambda_{\max} 2.47$ $m\mu$.

Da das Gentiopikrin bzw. sein Tetra- und Hexahydrierungsprodukt die gleichen Absorptionen im UV ergaben, wie die entsprechenden Acetate, war bewiesen, daß bei der Acetylierung keine Umlagerungen auftreten, die das chromophore System veränderten. Aus 60-proz. Alkohol kristallisiert das Gentiopikrin mit $\frac{1}{2}$ Mol. H_2O und schmilzt bei 121° , während es aus trockenem Essigester wasserfrei bei 191° schmilzt. Seine Summenformel ist $C_{16}H_{20}O_9$. Bei der in sehr schlechter Ausbeute verlaufenden Säure- wie auch Enzymspaltung entsteht ein Genin, $C_{10}H_{10}O_4$ und Glucose, die als Osazon und papierchromatographisch nachweisbar ist. Da das Gentiopikrin ein Tetraacetat bildet, enthält das Genin keine acetylierbare OH-Gruppe. Führt man die Verseifung des Gentiopikrin-tetraacetats allerdings in alkalischem Medium durch, so findet man bei der nachfolgenden Destillation einen 5 Acetylgruppen entsprechenden Wert.

Es ließ sich zeigen, daß es sich dabei um 4 Acetylgruppen und eine Formylgruppe handelt, die durch Zersetzung des Gentiopikrin-acetates entsteht. Bei der Verseifung in saurem Medium findet man immer nur den 4 Acetylgruppen entsprechenden Wert. Eine tertiäre Oxygruppe war ebenfalls unwahrscheinlich, da sich auch unter energischen Bedingungen⁹⁾ kein Pentaacetylderivat bildet. Damit in Übereinstimmung sind die Befunde bei der Bestimmung des aktiven Wasserstoffs nach Zerewitinoff. So geben das Hexahydro-protogentiogenin und das Tetrahydro-protogentiogenin, über deren Konstitution später berichtet wird, nur je ein aktives H, das von der OH-Gruppe stammt, an welche die Glucose gebunden war. Ebenso läßt sich keine CO-Gruppe nachweisen. Weder mit Phenylhydrazin, noch mit Hydroxylamin oder Semicarbazid läßt sich ein Umsetzungsprodukt fassen.

Mit *p*-Nitrophenylhydrazin bildet sich jedoch nach dreitägigem Aufbewahren in essigsaurem Medium ein Kondensationsprodukt, das entweder ein Hydrazid (durch Lactonringöffnung) oder aber das Kondensationsprodukt mit einem Zersetzungsprodukt des Gentiopikrins darstellt. Von dem in seiner Struktur ähnlich gebauten Patulin (IV) ist bekannt, daß es unter solchen Bedingungen eine Pyranringspaltung zu V erleidet¹⁰⁾.



An Hand der Analysenergebnisse ist es jedoch nicht möglich, zwischen solchen Umsetzungsprodukten zu unterscheiden. Bewiesen ist nur, daß keine normale C=O-Gruppe in Gentiopikrin anwesend ist.

Durch Lactontitration läßt sich die Anwesenheit eines Lactonringes leicht nachweisen. Von den 4 Sauerstoffen, die das Genin nach der Analyse enthält, entfallen also 2 auf die Lactongruppe. Ein weiteres ist glykosidisch

⁹⁾ A. Spassow, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 1926 [1937].

¹⁰⁾ R. B. Woodward u. G. Singh, Experientia [Basel] 6, 238 [1950].

mit dem Zucker gebunden. Da man im Tetraacetyl-gentiopikrin keine OCH_3 -, OC_2H_5 - oder OC_3H_7 -Gruppe nachweisen kann, wird der restliche Sauerstoff entweder einem höheren aliphatischen Äther oder einem Ring angehören. Zunächst paßt die Analyse besser auf die Formulierung mit dem Ringsauerstoff. Hinzu kommt folgender Befund: Das Gentiopikrin-tetraacetat, wie auch sein Tetra-Hydrierungsprodukt lassen sich bei Vermeiden eines langen Destillationsweges i. Vak. bei 200° unzersetzt destillieren, was man eher von einer Ringverbindung, als von einem langkettigen aliphatischen Äther erwarten sollte.

Durch diesen Destillationsbefund ist weiter gezeigt, daß der bei der trockenen Destillation des Tetrahydro-gentiopikrins von Asahina⁴⁾ nachgewiesene *n*-Butyraldehyd ein Sekundärprodukt ist und nicht als direkter Hinweis zur Konstitution gewertet werden kann. Bei Temperaturen oberhalb von 200° und besonders bei Ausführung einer trockenen Destillation lassen sich Umlagerungen und Sekundärreaktionen nie mit Sicherheit ausschließen. Ebenso lassen sich bei der Ätherspaltung mit Jodwasserstoff keine Produkte isolieren, die man bei dem Vorliegen eines aliphatischen Äthers erwarten sollte.

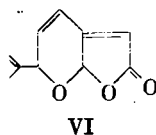
Da die Analyse ein Ringsauerstoff-Atom verlangt, darf nach diesen Befunden ein solches als genügend gesichert gelten. Damit sind die Funktionen der 4 Sauerstoffatome des Genins festgelegt. 2 haben Lactoncharakter, eins ist im Ring gebunden, und das letzte ist glykosidisch mit dem Zucker verknüpft.

Nach der Festlegung der Summenformel, der Sauerstofffunktionen, der Anordnung der Doppelbindungen in Konjugation und dem Auffinden des Formaldehyds bei der Ozonisierung war es nun wünschenswert, Abbauprodukte zu fassen, die möglichst das intakte Pyransystem enthielten. Dabei zeigte sich bald, daß das Gentiopikrin hierfür ungeeignet ist, da es bei allen Oxydationsverfahren vollständig abgebaut wird. Von Wichtigkeit war der Befund, daß sich bei der Oxydation des Gentiopikrins mit Kaliumpermanganat in wäßr. Medium Essigsäure bildet. Ferner entsteht beim Erhitzen mit Barytwasser Ameisensäure und Kohlendioxyd. Der Befund von Asahina⁴⁾, daß bei der Oxydation des Tetrahydro-gentiopikrins mit Kaliumpermanganat Propionsäure entsteht, konnte beim Tetrahydro-gentiogenin nicht bestätigt werden, trotz Anwendung papierchromatographischer Methoden. Ebenso ließ sich aus der Mesogentiogenin-Fraktion nach Umsetzung mit Wasserstoffperoxyd keine Bernsteinsäure isolieren, so daß in beiden Fällen mit der Störung durch die Glucose gerechnet werden muß. Das Auffinden der Essigsäure bei der Oxydation in Verbindung mit dem Befund, daß bei der Ozonisation Formaldehyd auftritt, ließ vermuten, daß eine Methyl-vinyl-Seitenkette vorlag.

Die UR-Absorption des Gentiopikrins, des Tetrahydro-gentiopikrins und des Hexahydro-gentiopikrins steht mit dieser Annahme in guter Übereinstimmung. Im Gentiopikrin läßt sich nämlich mit großer Wahrscheinlichkeit das Vorliegen einer Vinylgruppe ausschließen, da die für eine solche Gruppe typischen Frequenzen bei 990 cm^{-1} und 910 cm^{-1} fehlen. Dagegen kann die Bande bei 885 cm^{-1} als charakteristisch für die Isopropenylgruppe angesehen werden. Beim Hydrieren verschwindet die Bande bei 885 cm^{-1} , während bei 1165 cm^{-1} und 1150 cm^{-1} neue erscheinen, die der Isopropylgruppierung zugeordnet werden können^{10a)}.

^{10a)} N. Shephard u. D. H. Simpson, Quart. Rev. (chem. Soc., London) VII, No 1 [1953].

Die Aussagen über die Anwesenheit der Isopropenylgruppe im Gentiopikrin-acetat an Hand des UR-Spektrums sind natürlich mit der nötigen Vorsicht zu werten, da die acetylierte Glucose des Moleküls eine sehr starke Eigenabsorption hat. Die Analyse der UR-Spektren der Genine, über die später berichtet wird, ist sehr viel deutlicher und beweiskräftiger als die der Glykoside selber und zeigt sehr schön die typischen Isopropylbanden in den verschiedensten Hydrierungsprodukten der Genine. Auf Grund dieser Befunde wird das Ringsystem nach VI festgelegt.



Eine Bestätigung dieser Formulierung ließ sich auf folgendem Wege erbringen: Bei der Ozonspaltung des Tetrahydro-gentiopikrins und anschließender hydrierender Spaltung entsteht neben Ameisensäure ein bei etwa 170 bis 180°/1 Torr siedendes Öl. Da die Menge dieses Öls bei der Schwierigkeit der Beschaffung des Ausgangsmaterials sehr gering war, wurde auf eine Konstitutionsaufklärung dieser Fraktion zunächst verzichtet. Es wurde lediglich durch Lactontitration wahrscheinlich gemacht, daß es sich um ein Lacton handelt. Bei der Oxydation in alkalischem Medium mit Kaliumpermanganat läßt sich allerdings in schlechter und wechselnder Ausbeute Isobuttersäure als Toluidid und papierchromatographisch isolieren, wodurch die Anwesenheit der Isopropylseitenkette weiter gesichert ist. Ferner zeigt dieser Befund, daß die Seitenkette in α -Stellung zum Äthersauerstoff steht.

Durch die bisher mitgeteilten Ergebnisse ist die Konstitution des Gentiopikrins bis auf die Halbacetalgruppierung des α -Oxy-pyranringes und die Stellung der Glucosyloxy-Gruppe festgelegt. Für das Vorliegen einer Halbacetalgruppierung spricht die außerordentliche Empfindlichkeit gegenüber Alkali, wie auch gegenüber Säure. Im alkalischen Medium öffnet sich der Lactonring, und das jetzt vorliegende α -Oxy-pyran-Ringsystem spaltet sofort unter Zerstörung des Moleküls Wasser ab.

Vom unsubstituierten α -Oxy-pyran ist eine solche Wasserabspaltung lediglich durch Änderung des p_H bereits beschrieben¹¹⁾. Die gleichen Zersetzungsercheinungen finden sich beim Patulin und Allopatulin¹²⁾, deren Reaktionen in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse sind, da sie dem Formelbild des Gentiopikrins sehr ähneln. So entsteht bereits bei der katalytischen Hydrierung mit Pd-Bariumsulfat innerhalb von 20 Min. die Desoxyapatulinsäure¹³⁾ in 27-proz. Ausbeute. Das entspricht völlig der Tatsache, daß es bisher nicht gelungen ist, den Lactonring zu öffnen und die freie Säure ohne Änderung des Moleküls zu isolieren. Beim Patulin, wie auch beim α -Oxy-pyran stabilisiert sich das Molekül durch Wasserabspaltung zur Desoxyapatulinsäure bzw. zum Dehydropyran¹¹⁾.

Beim Gentiopikrin liegen die Verhältnisse nun wesentlich komplizierter, da eine Wasserabspaltung wegen der in α - β - zur Lactongruppierung stehenden Doppelbindung nicht möglich ist. Diese Tatsache führt augenscheinlich zu bisher nicht übersehbaren Umlagerungen. Aus dem gleichen Grunde läßt sich auch kein einheitliches Reaktionsprodukt fassen, wenn man das Gentio-

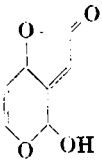
¹¹⁾ R. D. Brown, J. chem. Soc. [London] 1951, 2672.

¹²⁾ R. B. Woodward u. G. Singh, J. Amer. chem. Soc. 72, 1428, 5351 [1950].

¹³⁾ B. G. Engel, W. Brzeski u. Pl. A. Plattner, Helv. chim. Acta 32, 1166 [1949].

pikrin der bei α -Oxyppyranen üblichen Ringöffnung mit Chlorwasserstoff in Aceton und Wasser unterwirft¹⁴⁾.

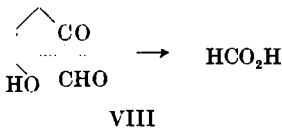
Ein weiteres Beispiel möge die große Umlagerungstendenz dieser Stoffklasse zeigen^{15, 10)}. Erhitzt man Patulin mit Salzsäure, so entsteht neben Kohlendioxyd das 2.3-Diketopentan. Ebenso gibt die ausführliche UR-Untersuchung des Patulins durch J. F. Grove¹⁶⁾ einen Beweis für die oft schwer deutbaren Strukturverhältnisse in dieser Stoffklasse. Um die Absorptionsbanden zu verstehen, soll neben dem normalen Patulin der Formel IV noch ein weiteres (VII) zu einem geringen Anteil vorliegen.



VII

Diese Beispiele zeigen, daß substituierte ungesättigte α -Oxyppyrane Substanzen sind, die leicht unübersichtliche Umlagerungen geben können, so daß man bei Konstitutionsaufklärungen nur mit größter Vorsicht Analogieschlüsse aus Reaktionen anderer Stoffklassen ziehen darf.

Spaltet man das Tetrahydro-gentiopikrin mit Ozon, so erhält man unter anderem Ameisensäure. Ihr Auftreten wird so gedeutet, daß nach der hydrierenden Spaltung des Ozonids mit Alkali der Lactonring aufgeht. Das jetzt entstehende hypothetische α -Oxy- β -keto-pyran, oder, in der offenen Form¹⁷⁾ als Oxy-keto-aldehyd VIII geschrieben, verliert dann in wäßr. Medium Ameisensäure.



VIII

Diese Annahme entspricht dem experimentellen Befund, daß beim Erhitzen von Mesogentiogenin^{4, 5)} mit gesättigter Bariumhydroxyd-Lösung neben 1 Mol. Kohlendioxyd

nach papierchromatographischen Werten auch etwa 1 Mol. Ameisensäure gefunden wird. Dabei wird die Ameisensäure dem Aldehyd, das Kohlendioxyd dagegen nach Decarboxylierung der α -Ketosäure der Lactongruppierung entsprechen.

Die Konstitutionsformel des Gentiopikrins deutet so alle experimentellen Befunde zwanglos. Zum endgültigen Beweis der Halbacetalgruppierung erschien es wünschenswert, die potentielle Aldehydgruppe direkt zu erfassen. Das gelang nun durch Umsetzung mit Triphenyltetrazoliumchlorid. In Analogie zu der Reduktionswirkung der Zucker mußte erwartet werden, daß auch das Gentiopikrin in alkalischem Medium, also nach Öffnen des Lactonringes, die einer Aldehydgruppe entsprechende Reduktionswirkung haben müßte. Dieses ließ sich experimentell bestätigen, und sogar zur quantitativen Bestimmungsmethode ausbauen. Erhitzt man in alkalischem Medium Gentiopikrin, Tetrahydro-gentiopikrin oder auch Hexahydro-gentiopikrin mit Triphenyltetrazoliumchlorid, so erhält man in allen 3 Fällen den einer Aldehydgruppe entsprechenden Formazanfarbwert. Das gleiche Ergebnis erhält man mit allen Spaltprodukten, so mit der Mesogentiogeninfraktion, Eugentiogenin

¹⁴⁾ R. I. Longley u. W. S. Emerson, J. Amer. chem. Soc. **72**, 3079 [1950].

¹⁵⁾ W. Th. Nauta, H. K. Dostelius, A. C. van der Linden, P. van Deyn u. J. W. Dienske, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **65**, 865 [1946].

¹⁶⁾ J. chem. Soc. [London] **1951**, 881.

¹⁷⁾ S. D. Hurd u. W. H. Saunders, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5324 [1952].

und Tanretischem Gentiogenin. Dieser Befund beweist, daß die Halbacetalgruppierung in allen genannten Substanzen vorhanden ist. Löst man das Gentiopikrin in n_{10} NaOH und säuert nach 10 Min. an, so erhält man keine Reduktion des Triphenyltetrazoliumchlorids, wodurch der Beweis erbracht ist, daß die Halbacetalgruppierung unter diesen Bedingungen bereits zerstört ist. In Analogie zum Gentiopikrin reagieren in gleicher Weise das Patulin, Allopautin und α -Oxy-pyran, wogegen die Desoxypatulinsäure, das 2.3-Dihydropyran und 5- und 6-Ringlactone keine Reduktionswirkung haben. Durch den Vergleich mit dem Patulin, dessen Abbauprodukten und den oben erwähnten synthetischen Substanzen ist damit sichergestellt, daß die Formazanbildung eine Folge der vorhandenen O-C-O-Halbacetalgruppierung ist. Der Farbttest mit Triphenyltetrazoliumchlorid läßt sich also beim Gentiopikrin, wie auch beim Patulin und Allopautin direkt als Test auf die noch intakte Halbacetalgruppierung verwenden.

Dieser Farbttest gestattet aber nicht nur durch das Erfassen der Halbacetalgruppierung einen Hinweis auf die Konstitution des Gentiopikrins, sondern erlaubt auch dessen quantitative papierchromatographische Bestimmung. Dazu ist es lediglich notwendig, den Methanolextrakt der zu untersuchenden Gentianawurzel einzudampfen, und in solcher Menge auf ein Papier aufzutragen, daß die Gentiopikrinmenge pro Fleck etwa 20 bis 50 γ beträgt. So erhält man nach der von K. Wallenfels¹⁸⁾ und auch von O. Lüderitz und O. Westphal¹⁹⁾ zur Bestimmung von Zuckern beschriebenen Methodik mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$ direkt die Konzentration des Gentiopikrins in der Wurzel, wobei man die Extinktion bei 490 m μ ausmisst. R_f 0.39 (wasserges. Butanol).

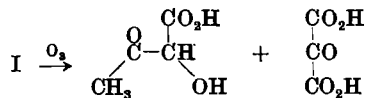
Betrachtet man nun zusammenfassend das Formelbild des Gentiopikrins, so ist die -O-C-O-Gruppierung zunächst durch die Unbeständigkeit der Substanz wahrscheinlich gemacht. Diese Halbacetalgruppierung gestattet ferner die später beschriebene Deutung der Ergebnisse bei der enzymatischen Hydrolyse, bei der aus optisch aktiven Verbindungen Racemate durch Isomerisierung entstehen. Sie erklärt das Auftreten der Ameisensäure neben Kohlendioxyd beim Behandeln der Mesogentiogeninfraktion mit Bariumhydroxyd. Ebenso läßt sich das Auffinden der Ameisensäure bei der Ozonisation des Tetrahydro-gentiopikrin-acetats deuten. Ferner macht diese Gruppierung den Befund verständlich, daß es trotz Bemühungen nicht gelang, Abbauprodukte mit intaktem Pyranring zu fassen. All diese Ergebnisse gehen denen am Patulin und Allopautin völlig parallel. Nachweisen ließ sich die Halbacetalgruppierung schließlich nach Ausschließen einer Aldehyd- oder Ketogruppe durch das Auffinden des quantitativen Bestimmungsverfahrens mit Triphenyltetrazoliumchlorid, so daß an dem Vorliegen der -O-C-O-Gruppierung kein Zweifel bestehen kann.

Die Isopropenylgruppe ist durch die Abbauprodukte Formaldehyd, Essigsäure und Isobuttersäure nachgewiesen. Zur Unterstützung dieser Befunde läßt sich ihre Anwesenheit auch im UR-Spektrum zeigen. Durch die Isolierung von Isobuttersäure ist gleichzeitig ihre Stellung am Pyranring festgelegt. Betrachtet man jetzt noch die Hydrierungsbefunde und deren Deutung durch das UV-Spektrum und die Lockerung der glykosidischen Bindung beim Hy-

¹⁸⁾ Naturwissenschaften **37**, 491 [1950]. ¹⁹⁾ Z. Naturforsch. **7 b**, 548 [1952].

drieren des Tetrahydro-gentiopikrins zum Hexahydro-gentiopikrin, was für eine Verknüpfung der Glucosyloxygruppe mit dieser Doppelbindung spricht, so läßt sich unter Berücksichtigung der bereits vorher beschriebenen experimentellen Ergebnisse für das Gentiopikrin keine die Befunde besser deutende Strukturformel aufstellen. Es ist vielleicht von Interesse, daß diese Formulierung als einzige von allen während der Bearbeitung diskutierten Strukturen der Isoprenregel genügt.

Wenn die Formel I des Gentiopikrins stimmt, so sollte neben der Oxalsäure bei der Ozonisation Mesoxalsäure-dialdehyd und α -Oxy-acetessigsäure, bzw. deren Aldehyd erwartet werden.



Wenn man die Ozonisation in Wasser bei 25° ausführt, 30 Min. alkalisch stehen läßt, um das Ozonid zu spalten, und anschließend ansäuert, so decarboxyliert die entstandene Verbindung sofort bei 25° und man kann 0.9 Moll. CO₂ als BaCO₃ nachweisen. Diese Reaktion läßt sich zwanglos durch das Formelbild deuten, wobei das Kohlendioxyd durch Decarboxylierung der α -Oxy-acetessigsäure entsteht. Daneben läßt sich die Oxalsäure fassen, während sich der Mesoxalsäuredialdehyd dem Nachweis durch Sekundärreaktionen entzieht.

Während der Konstitutionsaufklärung wurde versucht, beim Gentiopikrin eine Beziehung zwischen Konstitution und bitterem Geschmack zu finden. Dabei zeigte sich, daß Gentiopikrin, Tetrahydro-gentiopikrin, Hexahydro-gentiopikrin sowie deren Acetate bitter schmeckten. Alle zuckerfreien Produkte dagegen waren geschmacklos. In alkalischem Medium verlieren die bitteren Lösungen der zuerst genannten Substanzen sofort alle Bitterkeit, was sich wohl durch die Öffnung des Lactonringes, der augenscheinlich für die Ausbildung des Geschmacks wichtig ist, deuten läßt. Zusammen mit dem Befund, daß die Hydrierung keinen oder nur einen sehr schwachen Einfluß auf den Geschmack hat, bestätigen sich hier die bei vielen anderen Bitterstoffen gemachten Erfahrungen, daß es nicht möglich ist, das Phänomen des bitteren Geschmacks durch eine chemische Konstitution zu deuten²⁰⁾. Über die Verknüpfung der Glucosyloxygruppe sowie über die Konstitution der verschiedenen Enzymspaltprodukte wird später berichtet werden. Die endgültige Beweisführung der Richtigkeit der Formel bleibt natürlich, wie in allen Fällen, der Synthese vorbehalten, deren bisherige Ergebnisse später beschrieben werden.

²⁰⁾ Herrn Prof. Dr. R. Tschesche möchte ich auch an dieser Stelle herzlich für sein Interesse und die Überlassung eines Arbeitsplatzes, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung der Arbeit danken.

Beschreibung der Versuche

Isolierung des Gentiopikrins aus der frischen Wurzel von *Gentiana lutea*^{3, 4)}: 2 kg frischer Enzianwurzel (*Gentiana lutea*) werden in kleine Stücke geschnitten und in einem Blechtopf mit soviel siedendem Methanol übergossen, daß die Stücke gerade bedeckt sind (2–3 l). Man erhitzt noch etwa 15 Min. auf dem Wasserbad und preßt dann scharf ab. Nach Wiederholen der Extraktion unter gleichen Bedin-

²⁰⁾ Vergl. I. Mittel.: F. Korte, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 58, 295 [1953].

gungen befindet sich der Bitterstoff praktisch vollkommen in der Methanol-Lösung. Diese wird filtriert und möglichst schnell i. Vak. bei einer Badtemperatur von höchstens 50° eingedampft. Dabei entsteht ein Sirup, der, um das folgende Ausschütteln mit Essigester zu erleichtern, nicht zu zähflüssig sein soll. Es lassen sich hier keine genauen Daten angeben, da das Trennen der Phasen beim Ausschütteln sehr vom Alter und der Vorbehandlung der Wurzel abhängt. In diesem Stadium ist es wichtig, auf der einen Seite möglichst wenig wäßrige Lösung zu haben, da das Gentiopikrin in Wasser sehr leicht löslich ist, auf der anderen Seite den Sirup aber nur so viskos zu bekommen, daß er sich beim Ausschütteln mit Essigester glatt abtrennt. Es ist aber leicht, durch eine Ausschüttelkontrolle während des Eindampfens den günstigsten Punkt zu finden. Um das Abtrennen der beiden Phasen weiter zu erleichtern, ist es empfehlenswert, den nach dem Abdampfen des Methanols erhaltenen Sirup zu filtrieren. Die dabei entstehende klare Lösung (ungefähr 300 ccm) wird 15mal mit je 300 ccm wassergesättigtem Essigester ausgeschüttelt und nach kurzem Trocknen über Natriumsulfat i. Vak. bei einer Badtemperatur von 50° eingedampft. Wenn die Wurzel noch ganz frisch war, fällt an dieser Stelle ein fast farbloses Pulver an, das nach dem Umkristallisieren aus Essigester direkt reines Gentiopikrin ergibt. Ist die Wurzel jedoch schon einige Zeit gelagert, so treten schon hier in steigendem Maße gelb bis braun gefärbte Fraktionen auf, aus denen Gentiopikrin durch einfaches Kristallisieren aus Essigester nicht mehr zu gewinnen ist. Diese Veränderungen beim Lagern der Wurzel wurden bereits von Tanret auf die Anwesenheit wirksamer Fermente zurückgeführt. Wenn die frisch geerntete Wurzel eine Woche bei Zimmertemperatur aufbewahrt ist, macht die direkte Kristallisation aus Essigester bereits erhebliche Schwierigkeiten. Im Kühlraum bei -10° hält sich die Wurzel jedoch einige Monate, wobei aber auch in diesem Fall die Reindarstellung des Gentiopikrins schwieriger ist als beim Benutzen der frischen Wurzel.

Erhält man nach dem Abdampfen des Essigesters ein stark gefärbtes oder schmieriges Produkt, so reinigt man es am besten chromatographisch. Man verfährt dabei so, daß man das Rohprodukt in Aceton unter Zugabe einiger Prozent Wasser löst und an der etwa 500fachen Menge Aluminiumoxyd (neutral, Woelm), die man vorher mit Aceton in eine Säule einschlämmt, chromatographiert. Man löst dabei die Gentiopikrinfraktion mit Aceton-Wasser 1:1 von der Säule. Als Test wählt man den ausgeprägt bitteren Geschmack der Fraktion. Es lassen sich hier keine genaueren Angaben machen, da das chromatographische Verhalten sehr von den Nebenbestandteilen und damit von der Vorbehandlung der Wurzel abhängt. Man wird jedoch grundsätzlich immer mit dieser Art der Chromatographie zum Ziel kommen und diese bei sehr stark verunreinigten Fraktionen u. U. wiederholen. Die bittere Fraktion wird i. Vak. schnell eingedampft, Badtemperatur 50°, und aus Essigester, evtl. unter Zugabe von 10% Aceton, umkristallisiert. Man erhält nach dem Umkristallisieren aus 50-proz. Alkohol reines Gentiopikrin mit $\frac{1}{2}$ Mol. Kristallwasser vom Schmp. 121°. Aus wasserfreiem Essigester schmilzt es bei 191°. Ausb. bei Anwendung frischer Wurzel 1.5%, bei 2 Monate im Kühlraum bei -10° gelagerter Wurzel und Anwendung von 50 kg Enzianwurzel als Ausgangsmaterial 0.1%. Es empfiehlt sich daher, zur Aufarbeitung als Höchstmenge 2-3 kg zu nehmen, da es sehr wichtig ist, alle Operationen innerhalb von spätestens 3 Tagen beendet zu haben.

$C_{16}H_{20}O_9 + \frac{1}{2} H_2O$ (365.3) Ber. C 53.92 H 5.66 Gef. C 53.82 H 5.55

Gentiopikrin-tetraacetat: 1 g Gentiopikrin wird in 4 ccm Pyridin gelöst und mit 20 ccm Acetanhydrid versetzt. Nach zweitägigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur gießt man in 200 ccm Wasser, filtriert nach 15 Min. langem Stehenlassen das ausgefallene Acetat ab, löst es mit Methanol vom Filter und dampft zur Trockne. Zur Reinigung löst man es am besten in Benzol und chromatographiert aus Benzol-Lösung an Aluminiumoxyd (Woelm, neutral), wobei das Gentiopikrin-tetraacetat durchläuft. Nach dem Eindampfen und Umkristallisieren aus Methanol bei -10° erhält man so etwa 400 mg Gentiopikrin-tetraacetat vom Schmp. 138.5-139.5°.

$C_{24}H_{28}O_{13}$ (524.5) Ber. C 54.94 H 5.39 4 Acetyl 32.80
Gef. C 55.00 H 5.44 4 Acetyl 32.10

Bei alkalischer Verseifung findet man bei der Acetylgruppenbestimmung einen etwa 5 Moll. entsprechenden Wert.

5 Acetyl Ber. 37.99 Gef. 37.29

Durch fraktionierte Destillation einer größeren Menge konnte jedoch gezeigt werden, daß hier nicht 5 Moll. Essigsäure vorliegen, sondern neben 4 Moll. Essigsäure 1 Mol. Ameisensäure.

Verseifung des Gentiopikrin-tetraacetats zum Gentiopikrin⁶): 4 g Kaliumhydrogencarbonat wurden in 200 ccm Wasser gelöst und mit 1 l Methanol versetzt, in dem 4 g Gentiopikrin-tetraacetat gelöst waren. Nach 10tägig. Stehenlassen bei Zimmertemperatur dampft man das Methanol ab, nimmt mit Wasser auf und schüttelt erschöpfend mit Essigester aus. Beim Umkristallisieren aus Essigester läßt sich kein reines Gentiopikrin kristallin erhalten.

Spaltung nach Zemplén⁷): 3 g Gentiopikrin-tetraacetat werden in 12 ccm absol. Methanol suspendiert und nach Zugabe von 3 ccm n_{10} CH_3ONa 3 Stdn. bei 20° stengelassen. Dann zersetzt man das Natriummethylat mit Essigsäure, dampft ein und kristallisiert aus Methanol um. Man erhält so 2 g Gentiopikrin-tetraacetat zurück (Schmp. 139°). In einem anderen Versuch wurde 1 g Gentiopikrin-tetraacetat mit 10 ccm einer Lösung von 100 mg Natrium in 500 ccm absol. Methanol versetzt. Zum Lösen des gesamten Gentiopikrin-tetraacetats gibt man noch weitere 40 ccm absol. Methanol hinzu und läßt es einen Tag bei -10° stehen. Nach Zugabe der dem Natriummethylat äquivalenten Essigsäure wird eingedampft und aus Essigester umkristallisiert. Dabei fällt zunächst eine sehr hygroskopische Substanz aus. Nach mehrmaligem Wiederholen des Umfällens gibt sie ein farbloses, schlecht kristallisierendes Pulver ab, das sich jedoch als Gentiopikrin identifizieren ließ. Schmp. 191°, α_D -198°. Ausb. 50 mg.

Säurespaltung des Gentiopikrins: 100 mg Gentiopikrin werden in 20 ccm 50-proz. Methanol mit 20 ccm 2*n*HCl 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abdampfen des Methanols fällt dabei ein dunkelbrauner amorpher Stoff aus, der nach der Reinigung durch sehr langwierige Kristallisation aus Methanol-Wasser Gentiogenin in einer Höchstausbeute von 5-8 mg ergibt. Die Substanz zeigt die Tanretsche, wie auch Asahina-Jodasche Farbreaktion auf Gentiogenin. Die wäbr. Lösung wird mit Phenylhydrazin umgesetzt, wobei man Glucosazon erhält, dessen Menge einer Glucoseeinheit im Gentiopikrin entspricht. Den gleichen Wert ergab die quantitative Papierchromatographie der Glucose.

Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetat: Man löst 1 g Gentiopikrin-tetraacetat in 20 ccm Eisessig, setzt eine Spatelspitze Platinoxid hinzu und hydriert. Dabei werden innerhalb von 15 Min. etwa 90 ccm Wasserstoff aufgenommen, was ungefähr 2 Moll. entspricht. Anschließend wird vom Katalysator abfiltriert, eingedampft und aus Methanol umkristallisiert. Man erhält so 170 g eines einheitlichen Produktes, das bei 208° schmilzt und Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetat darstellt. α_D -48° (in Chloroform).

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$ (528.5) Ber. C 54.54 H 6.06 Gef. C 54.45 H 5.95

Daneben erhält man als leichter lösliche Komponente in einer Ausbeute von etwa 80 mg ein Produkt, welches bei 161-164° schmilzt. Dies Produkt ist das von Asahina als β -Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetat beschriebene. α_D -120.5° (in Chloroform).

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$ (528.5) Ber. C 54.53 H 6.06 Gef. C 54.22 H 5.85

Nachacetylierung des β -Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetats: 50 mg β -Tetrahydro-gentiopikrin-tetraacetat vom Schmp. 160° werden in 1 ccm Pyridin gelöst und mit 20 ccm Acetanhydrid 3 Tage bei 37° stengelassen. Anschließend gießt man in 150 ccm Wasser, wobei eine farblose Substanz ausfällt. Man filtriert ab und trocknet. Ohne Umkristallisation liegt der Schmp. jetzt bei 174-178°, ohne daß sich das UV-Spektrum gegenüber dem Ausgangsprodukt ändert. Nach Umkristallisieren aus Methanol erhält man 15 mg einer Substanz vom Schmp. 186°.

Gef. C 54.58 H 6.01 5 Acetyl 37.29

Hexahydro-gentiopikrin-tetraacetat: 1 g Gentiopikrin-tetraacetat wird in 20 ccm Eisessig gelöst und unter Zusatz von 50 mg Platinoyd hydriert. Dabei werden etwa 90 ccm Wasserstoff innerhalb von $\frac{1}{4}$ Stde. aufgenommen. Die Wasserstoffaufnahme wird dann langsamer und erreicht erst nach etwa 20 Stdn. den Endwert, wobei etwa 130 ccm verbraucht werden (3 Mol = 137 ccm bei 20°). Man filtriert vom Katalysator ab, dampft i. Vak. zur Trockne und kristallisiert aus Alkohol um; Schmp. 154°. $\alpha_D - 54^\circ$ (in Chloroform).

$C_{24}H_{34}O_{13}$ (530.5) Ber. C 54.34 H 6.46 Gef. C 54.26 H 6.32

Das Tetrahydro-gentiopikrin-acetat vom Schmp. 208°, nimmt unter den gleichen Bedingungen ebenfalls 1 Mol. Wasserstoff auf und bildet das gleiche Hexahydro-gentiopikrin-tetraacetat vom Schmp. 154°.

Ozonspaltung von Gentiopikrin-tetraacetat: 2 g Gentiopikrin-tetraacetat werden in 50 ccm Chloroform gelöst. In diese Lösung leitet man 3 Stdn. einen mäßigen Strom ozonisierten Sauerstoff mit einem Ozongehalt von etwa 10%. Dann wird das Chloroform vorsichtig bei Raumtemperatur i. Vak. abgedampft und der Rückstand mit 40 ccm Wasser 1 Stde. unter starker Rückflußkühlung auf dem Wasserbade erwärmt. Anschließend werden von dem Wasser 30 ccm abdestilliert, zu dem Destillat eine alkohol. Lösung von 0.6 g Dimedon gegeben und 15 Min. erwärmt. Der Niederschlag ergibt aus Alkohol farblose Prismen vom Schmp. 190–191°. Ausb. 0.28 g. Diese Menge entspricht etwa 27% der theoret. Menge einer Vinylgruppe.

In einem anderen Ansatz wurde nach dem Abdestillieren durch Hinzufügen einer wäßr. Lösung von *p*-Nitrophenylhydrazin-hydrochlorid das gelbe Formaldehyd-*p*-nitrophenylhydrazon erhalten. Nadeln aus Alkohol vom Schmp. 181°; im Mischschmelzpt. mit dem Formaldehyd-*p*-nitrophenylhydrazon keine Erniedrigung.

Ozonisation des Gentiogenins: 200 mg Gentiogenin werden in 30 ccm Essigester gelöst und 1 Stde. mit einem 10% Ozon enthaltenden Sauerstoffstrom ozonisiert. Nach dem vorsichtigen Abdampfen des Chloroforms bei Zimmertemperatur i. Vak. erhitzt man 1 Stde. mit 10 ccm Wasser und findet unter den gleichen Bedingungen wie bereits vorher beschrieben Formaldehyd als Dimedon bzw. als *p*-Nitrophenylhydrazon.

Gentiogenin: 1 g Gentiopikrin wird 3 Stdn. mit 50 ccm 2-proz. Salzsäure unter Rückfluß erhitzt. Dabei fällt ein brauner, amorpher Stoff aus, aus dem sich durch Umkristallisieren aus Alkohol/Wasser das Gentiogenin in einer Ausbeute von 20–50 mg isolieren läßt. Bei allen Operationen sollte man das Gentiogenin möglichst wenig an der Luft erwärmen, da es sich außerordentlich leicht in rote Schmierer umwandelt, die die Reindarstellung sehr erschweren. Es läßt sich bei 100° trocknen und schmilzt dann bei 185°. Es ist nicht bitter, unlöslich in kaltem Wasser und Äther, wenig löslich in Essigester, gut löslich in Methanol. Löst man einige mg Gentiogenin in 4 Tropfen reiner Schwefelsäure und gibt nach etwa 1 Min. tropfenweise Wasser hinzu, so tritt eine intensiv blaue Färbung auf, die auch bei weiterem Wasserzusatz nicht verschwindet. Empfindlicher noch ist die folgende Probe; Man löst einige mg in 20-proz. Kalilauge und säuert nach 1 Min. mit konz. Salzsäure an. Auch hierbei entsteht eine tiefblaue Färbung.

$(C_{10}H_{10}O_4)_2$ (388.4) Ber. C 61.85 H 5.15

Gef. C 61.42 H 5.25 Mol.-Gew. (nach Rast) 370.4

Oxydation des Gentiopikrins mit Kaliumpermanganat: 10 g Gentiopikrin werden in 20 ccm 1*n* KOH gelöst und mit etwa 1000 ccm 5-proz. Permanganatlösung versetzt, die sich bei tropfenweiser Zugabe sofort entfärbt. Man filtriert das entstandene Mangandioxydhydrat ab und unterwirft die Lösung direkt der Papierchromatographie. Dabei erhält man einen diffusen Fleck an der Stelle, die der Ameisensäure und Essigsäure entspricht. Die Lösung wird nun zunächst alkalisch i. Vak. eingedampft, mit der der Kalilauge entspr. äquivalenten Menge Schwefelsäure angesäuert, und aus einem Gesamtvolumen von 10 ccm bei p_H 2 destilliert. Dabei lassen sich bei sauberer Fraktionierung Ameisensäure und Essigsäure nebeneinander fassen. Die beiden Fraktionen zeigen im Papierchromatogramm weitgehend einheitliche Flecke, die der Ameisensäure und Essigsäure entsprechen. Ebenso sind beide Substanzen als Anilide durch Mischschmelzpunkte identifiziert.

Tetrahydro-gentiopikrin: 1 g Gentiopikrin wird in 40 ccm Essigester gelöst und mit Pd-Tierkohle hydriert, wobei innerhalb von 10 bis 15 Min. 120 ccm Wasserstoff (für 2 Moll. ber. 128 ccm) absorbiert werden. Dann filtriert man vom Katalysator ab und dampft bei 50° Badtemperatur i. Vak. zur Trockne. Dabei entsteht ein schlecht kristallisierendes Öl, aus dem sich durch häufiges Umlösen aus Essigester farblose Kristalle vom Schmp. 191° bilden; Ausb. 80 mg. Das Produkt schmeckt stark bitter, ist in Wasser und in Alkohol löslich, und in Äther, Chloroform und Petroläther unlöslich. $\alpha_D -75.1^\circ$ (in Alkohol).

$C_{16}H_{24}O_9$ (360.4) Ber. C 53.33 H 6.66 Gef. C 53.51 H 6.40

Ozonisation des Tetrahydro-gentiopikrins: 5 g Tetrahydro-gentiopikrin werden in 40 ccm Wasser gelöst und bei +5° 5 Stdn. in einem 10% Ozon enthaltenden Sauerstoffstrom ozonisiert. Anschließend bringt man mit Natronlauge auf p_H 8 und läßt 1 Stde. stehen. Nach dem Ansäuern wird die Lösung erschöpfend mit Äther extrahiert, wobei etwa 1 $\frac{1}{2}$ g eines sehr stechend riechenden Öles zurückbleiben. Bei der Destillation läßt sich zunächst eine Fraktion gewinnen, die aus reiner Ameisensäure besteht. Weiter erhält man eine Fraktion, die bei 170° siedet. Da sie gegen Wasser neutral reagiert, und sich aus alkalischem Medium mit Äther nicht ausschütteln läßt, ist es möglich, daß diese Substanz ein Lacton darstellt. Sie wurde nun bei 100° in alkal. Medium mit Permanganat oxydiert, bis keine Umsetzung mehr erfolgte, vom Mangandioxydhydrat abfiltriert, die Lösung mit Salzsäure angesäuert, und wieder mit Äther erschöpfend ausgeschüttelt. Die erhaltene Fraktion riecht stark nach Buttersäure, und nach Umsetzung mit Toluidin ließen sich 10 mg des Toluidids der Isobuttersäure isolieren. Die Substanz gab mit authent. Material keine Erniedrigung im Misch-Schmelzpunkt.

Papierchromatographie des Gentiopikrins: Man löst 5 mg Gentiopikrin in 1 ccm Methanol und trägt von dieser Lösung 1 Tropfen, entspr. etwa 20–50 γ , auf ein Papier von Schleicher & Schüll, Nr. 2043a, auf. Anschließend entwickelt man mit wassergesätt. Butanol. Nach dem Laufenlassen über Nacht (Laufstrecke = 30 bis 35 cm) wird an der Luft getrocknet und mit einer Lösung von Tetrazoliumchlorid besprüht, die folgendermaßen bereitet war: man mischt gleiche Teile einer 0.2-proz. Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (wassergesätt. Butanol) und 2 n methanol. Kalilauge. Erhitzt man jetzt das so besprühte Papier in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei etwa 80°, so zeigt sich das Gentiopikrin als dunkelroter Fleck. R_F -Wert = 0.39. Der Fleck läßt sich nach Extraktion (10 Min.) mit 3% Chlorwasserstoff enthaltendem Pyridin ablösen, und dann im Beckman-Spektrophotometer bei 490 $m\mu$ photometrieren. Wichtig ist dabei das Konstanthalten der Entwicklungstemperatur und Zeit. Nach etwa 20 Min. Erhitzen bei 80° ist aber das Maximum der Farbbildung erreicht und man erhält bei einiger Übung Werte mit einer Genauigkeit von $\pm 3\%$.

83. Hellmut Bredereck, Helmut Dürr und Klaus Ruck: Chromatographische Trennungen acetylierter Mono- und Disaccharide

[Aus dem Institut für Organische Chemie und Organisch-chemische Technologie der Technischen Hochschule Stuttgart]

(Eingegangen am 12. Februar 1954)

Es wird eine Reihe von Modelltrennungen acetylierter Mono- und Disaccharide durch chromatographische Adsorptionsanalyse, ferner eine Acetylspaltung durch Aluminiumoxyd am Lactolhydroxyl bei Pentaacetylmonosen beschrieben.

Bei der Kondensation acetylierter bzw. methylierter Monosaccharide bilden sich mehrere α - β -isomere Mono- und Disaccharide, deren Isolierung nach den Methoden der klassischen Chemie nur bis zu einem gewissen Grad möglich