

## 120. Friedhelm Korte: Über neue glykosidische Pflanzeninhaltsstoffe IV. Mitteil.\*): Die Konstitution des Gentiopikrins und seiner enzymatischen Spaltprodukte

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstitutes der Universität Hamburg]

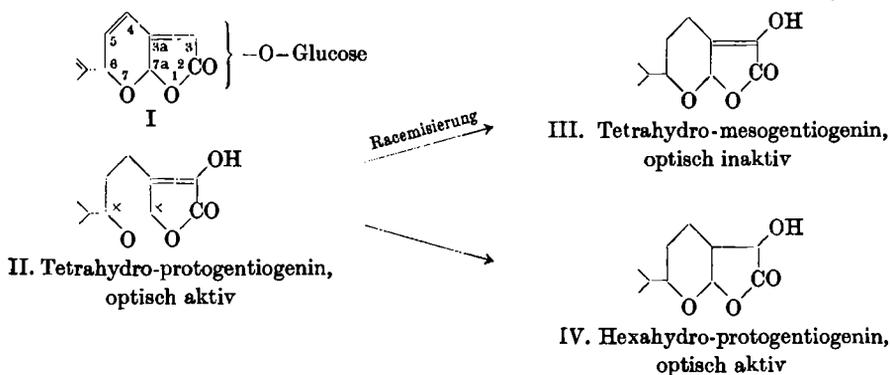
(Eingegangen am 20. März 1954)

Für das Gentiopikrin, den Bitterstoff der Gentianaceen, wird die Konstitutionsformel des 3-Glucosyloxy-2-oxo-6-isopropenyl-2.7a-dihydro-6 H-furano-(2.3-b)-pyrans gesichert. Die Strukturen des Mesogentiogenins, Eugentiogenins und „Tanretischen“ Gentiogenins werden besprochen.

In der II. Mitteil.<sup>1)</sup> wurde die Konstitution des Gentiopikrins bis auf die Verknüpfungsstelle mit der Glucosyloxy-Gruppe entspr. Formel I festgelegt.

Es war von vornherein wahrscheinlich, daß sich das glykosidisch gebundene Sauerstoffatom an der schwer hydrierbaren zum Lacton in Konjugation stehenden Doppelbindung befindet, da bei der Hydrierung des Tetrahydro-gentiopikrins in wäßr. Medium sich diese Glykosidbindung als so instabil erweist, daß man Glucose und das Hexahydro-protogentiogenin isolieren kann. Bei der Hydrierung des Gentiopikrins zum Tetrahydro-gentiopikrin unter gleichen Bedingungen bleibt die Glykosidbindung dagegen im wesentlichen erhalten.

Ferner ergibt das Tetrahydro-gentiopikrin bei der Ozonisation und anschließender hydrierender Spaltung des Ozonids mit Zink in Eisessig oder katalytischer Hydrierung Oxalsäure. Würde die glykosidische Sauerstoffbrücke nicht in  $\alpha$ -Stellung zur Lactongruppe stehen, so müßte man unter

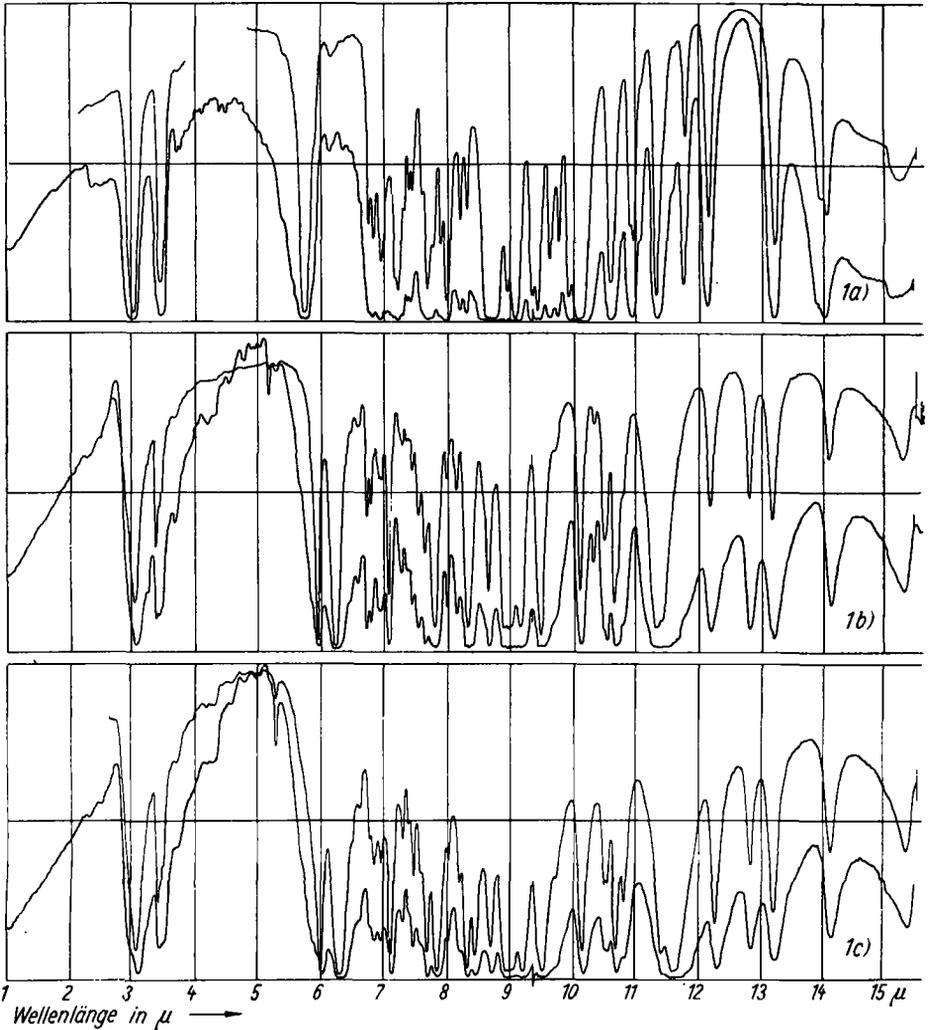


diesen Bedingungen Glyoxylsäure erwarten. In Parallelversuchen wurde bei der Ozonisation der Fumarsäure und des Cumarins Glyoxylsäure, bei dem enolisierten  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methyl- $\gamma$ -butyro-lacton dagegen Oxalsäure gefunden. Hinzu kommt der Befund, daß das Tetrahydro-protogentiogenin in alkoholischer Lösung mit einer 1-proz. alkoholischen Eisen(III)-chlorid-Lösung eine deutliche rote Enolreaktion gibt.

\* ) III. Mitteil.: F. Korte, Z. Naturforsch. **9b**, Heft 5 [1954].

<sup>1)</sup> F. Korte, Chem. Ber. **87**, 512 [1954].

In gleicher Weise sind die UR-Spektren des Tetrahydro-protogentiogenins und des Hexahydro-protogentiogenins zu deuten, die in den beiden Substanzen eine enolische Oxygruppe vermuten lassen. Das zeigt sich in der Verschiebung der OH-Bande im Tetrahydro-protogentiogenin (II) von  $3290\text{ cm}^{-1}$  und Tetrahydro-mesogentiogenin (III)  $3310\text{ cm}^{-1}$  nach  $3330\text{ cm}^{-1}$  im Hexahydro-protogentiogenin (IV). Dabei ist das Tetrahydro-protogentiogenin das optisch aktive Genin, das Tetrahydro-mesogentiogenin dessen Racemisierungsprodukt, während das Hexahydrogentiogenin sich vom ersten nur durch Hydrierung der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Doppelbindung an der sich die OH-Gruppe befindet, unterscheidet. In allen drei Verbindungen sind die Oxygruppen zwischenmolekular assoziiert\*\*).



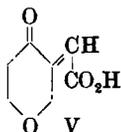
Abbild. 1a. UR-Spektrum des Hexahydro-protogentiogenins, in KBr gepreßt

Abbild. 1b. UR-Spektrum des Tetrahydro-protogentiogenins, in KBr gepreßt

Abbild. 1c. UR-Spektrum des Tetrahydro-mesogentiogenins, in KBr gepreßt

\*\*\*) Für die Aufnahme und Deutung aller UR-Spektren möchte ich auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. R. Mecke und Herrn Dr. W. Lüttke, Freiburg, herzlich danken.

Daß die OH-Gruppe in 4-Stellung im Pyranring steht, erschien von vornherein als ausgeschlossen. Eine solche Verbindung sollte nach den Erfahrungen beim Patulin und Allopatulin in der Ketoform vorliegen. Das dabei entstehende optische System absorbiert jedoch nicht bei 273  $m\mu$  wie das Mesogentiogenin, sondern nach R. B. Woodward und G. Singh<sup>2)</sup> in Verbindung V bei 240  $m\mu$ .



Damit war die OH-Gruppe in  $\alpha$ -Stellung zum Lacton an der schwer hydrierbaren Doppelbindung gesichert. Hinzu kommt noch, daß beim Erhitzen von Eugentiogenin VII mit *o*-Phenylendiamin in alkoholischem Medium ein braunes Reaktionsprodukt entsteht, das zwar nicht analysenrein dargestellt werden konnte, sich aber in allen Eigenschaften und im UV-Spektrum wie ein Chinoxalinderivat verhielt ( $\lambda_{\max}$  bei 240  $m\mu$  und  $\lambda_{\max}$  bei 275  $m\mu$ ).

Bei der Annahme dieser Formulierung lassen sich nun auch die sehr komplexen Reaktionsabläufe deuten, die bei der Enzymspaltung auftreten.

Im Gegensatz zu den im allgemeinen guten Ausbeuten bei Enzymspaltungen sind diese beim Gentiopikrin bei Anwendung der verschiedensten Enzyme sehr schlecht. Man bekommt immer nebeneinander mehrere Substanzen, die sich nur sehr schwer voneinander trennen lassen, und deren Reindarstellung Ausbeuten von maximal 8–10% ergibt. Y. Asahina<sup>3)</sup> hatte bereits zeigen können, daß das von Tanret als das Genin des Gentiopikrins beschriebene und Gentiogenin genannte Produkt nicht das ursprüngliche Genin darstellt, sondern ein Dimeres ist. Bei der Enzymolyse bekommt man als primäres Produkt durch kontinuierliche Ätherextraktion während der Enzymspaltung ein Öl, das „Mesogentiogenin“, das augenscheinlich dem ursprünglichen Genin am nächsten kommt. Dieses Öl gibt beim Hydrieren ein kristallines Tetrahydroderivat, das nach der Analyse und Mol.-Gew.-Bestimmung der Formel  $C_{10}H_{14}O_4$  entspricht.

Das Mesogentiogenin gibt eine deutliche Blaufärbung mit Eisenchlorid und reagiert nicht mit Phenylhydrazin, Hydroxylamin oder Semicarbazid. Eine Reinigung durch Destillation im Hochvakuum ist dabei nicht möglich. Papierchromatographisch zeigt es einen einheitlichen  $R_F$ -Wert von 0.85 in Butanol/Wasser und läßt sich unter der UV-Lampe sichtbar machen. Nach dem Ausschneiden der Flecke und dem Ablösen vom Papier zeigte das Mesogentiogenin eine Absorption im UV bei 273  $m\mu$ , die der des Gentiopikrins entspricht, wobei die geringe Verschiebung ins Langwellige durch die Lösung der Glykosidbindung hervorgerufen sein muß.

Hinzu kommt, daß die Mesogentiogeninfraction im Gegensatz zum Gentiopikrin optisch inaktiv ist, so daß bei der Enzymolyse eine Racemisierung erfolgt sein muß. Ferner war es bisher nur als Öl zu erhalten, dem keine konstanten Eigenschaften zuzuordnen waren. Es verharzt innerhalb weniger Stunden und lagert sich daneben in stabilere Verbindungen um (Gentiogenin,

<sup>2)</sup> R. B. Woodward u. G. Singh, *Experientia* [Basel] 6, 238 [1950].

<sup>3)</sup> Y. Asahina, J. Asano, Y. Tanase u. Y. Weno, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 69, 771 [1936].

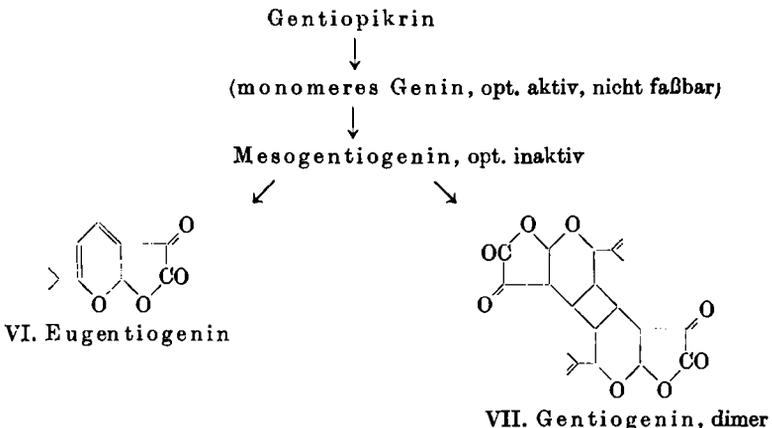
Eugentiogenin). Man darf das Mesogentiogenin daher nicht als eine einheitliche Substanz ansehen, sondern als eine Fraktion, die dem ursprünglich nicht faßbaren Genin des Gentiopikrins am nächsten kommt.

Extrahiert man während der Enzymolyse nicht den ganzen Ansatz kontinuierlich mit Äther, läßt also die Mesogentiogeninfraktion weiter mit dem Enzym in Berührung, so kann man diese nicht mehr isolieren. Man findet dann neben dem immer entstehenden dimeren Gentiogenin das Eugentiogenin (VI), das Asahina<sup>3</sup>) zuerst für das ursprüngliche Genin gehalten hatte.

Je nach dem  $p_H$ -Wert bei der Spaltung findet man nun verschiedene Mengen Eugentiogenin und Tanretisches Gentiogenin. Spaltet man jeweils 2 g Gentiopikrin bei  $p_H$  3, so erhält man neben 50 mg Eugentiogenin 50 mg Tanretisches Gentiogenin. Bei  $p_H$  7 erhält man noch 20 mg Eugentiogenin, neben 180 mg Tanretischen Gentiogenin (VII). Daneben bilden sich auch unter Sauerstoffabschluß rote harzige Produkte, die die Reindarstellung der Substanzen sehr erschweren.

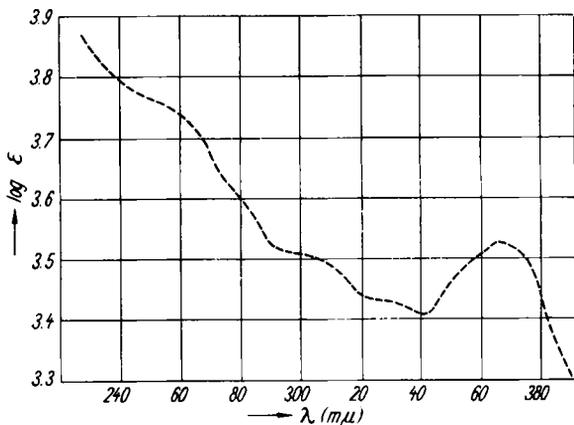
Das Eugentiogenin gibt mit Eisenchlorid nur eine schwache Gelbfärbung und ist in reinem Zustand schwach gelb gefärbt. Mit Phenylhydrazin reagiert es momentan, was auf die Anwesenheit einer Keto-Gruppe schließen läßt. Bei der Hydrierung liefert das Eugentiogenin ebenso wie das Mesogentiogenin zunächst ein öliges Produkt; es gelingt aber nur bei der Mesogentiogeninfraktion, in ganz geringer Ausbeute eine kristalline Substanz zu fassen. Beim Eugentiogenin schlugen alle Versuche zur Isolierung des Hydrierungsproduktes fehl.

Diese Enzymspaltungsversuche lassen sich in folgender Weise befriedigend deuten: Das erste Produkt, das bei der Enzymspaltung entsteht, das wirkliche Genin, ist nicht faßbar. Es müßte ebenso wie das Gentiopikrin optisch aktiv sein. Die unter schonendsten Bedingungen als erste zu isolierende Mesogentiogeninfraktion ist jedoch völlig inaktiv. Wird das Gentiopikrin erst



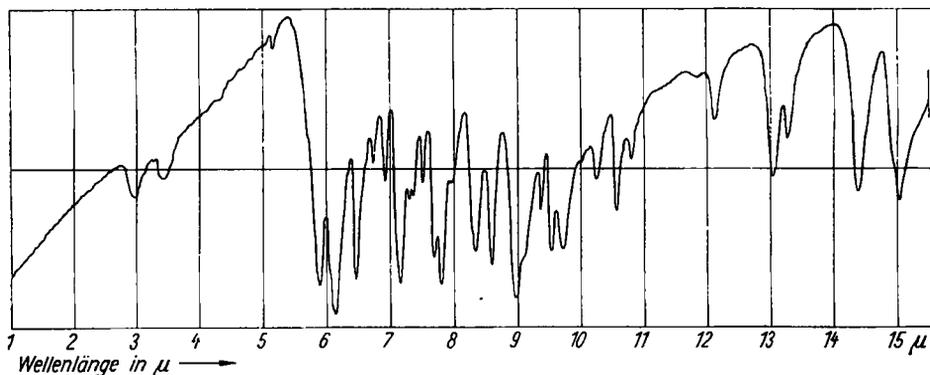
hydriert und dann enzymatisch gespalten, so ist das entstehende Tetrahydroprotogentiogenin optisch aktiv. Das unhydrierte Gentiopikrin racemisiert sich also bei der Enzymspaltung wegen der Unbeständigkeit des Lactonringes als Halbacetal, wie das beim Patulin und den Zuckern bekannt ist. Das erste faßbare Racemisierungsprodukt ist nun das als Öl isolierte Mesogentiogenin.

Dieses ist außerordentlich unbeständig und polymerisiert schnell zu einer spröden Masse. Läßt man die wäßr. Lösung des Mesogentiogenins einige Zeit mit dem Enzym (Emulsin, Luizym, Pilzenzym\*) in Berührung, so bildet sich das Eugentiogenin und das Tanretische Gentiogenin. Da das Eugentiogenin im Gegensatz zum Mesogentiogenin mit Phenylhydrazin sofort reagiert und ebenso im Gegensatz zu diesem mit Eisen(III)-chlorid keine deutliche Färbung gibt, dürfte in Übereinstimmung mit den analytischen Daten in dem hellgelben Eugentiogenin die Struktur eines  $\alpha$ -Ketolactons vorliegen.



Abbild. 2. UV-Spektrum des Eugentiogenins;  $c=0.01417$  g/l Methanol;  $\log \epsilon=3.52$ ,  $\lambda_{\max} = 367.5$  mμ

Diese durch chemische Befunde begründete Auffassung ist gefestigt durch das Fehlen einer ausgesprochenen OH-Bande im UR-Spektrum des Eugentiogenins. Die schwache OH-Bande ist mit Sicherheit auf den Wassergehalt des zur Messung benötigten Kaliumbromids zurückzuführen; in Lösung zeigt sich



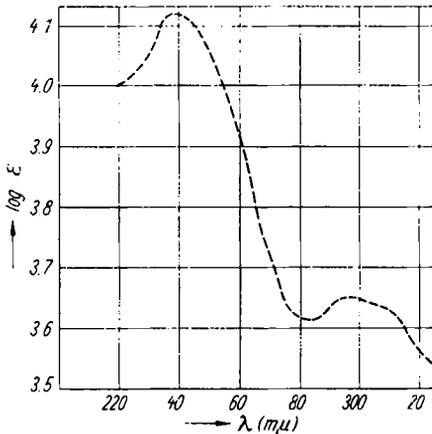
Abbild. 3. UR-Spektrum des Eugentiogenins, in KBr gepreßt

\*) Herrn Prof. Dr. K. Wallenfels, Freiburg, möchte ich auch an dieser Stelle herzlich für die Überlassung eines hochgereinigten Pilzenzymes danken.

keine OH-Frequenz. Ferner findet man hier ebenso wie in allen Hydrierungsprodukten des Gentiopikrins die typischen Schwingungen der Isopropylgruppe (bei 824, 926, 946, 974, 1165, 1333, 1374, 1400  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>4</sup>).

Eine weitere Stütze dieser Auffassung liefert folgender Befund: Läßt man das reine Eugentiogenin mit Emulsin in Berührung, so bildet sich daraus kein Gentiogenin mehr, aus Mesogentiogenin bilden sich unter den gleichen Bedingungen dagegen Eugentiogenin und Gentiogenin nebeneinander. Das heißt, daß Eugentiogenin nicht mehr zu der Dimerisierung zum Gentiogenin befähigt ist. Es war daher von besonderer Bedeutung, die Konstitution des Gentiogenins aufzuklären. Das Gentiogenin ist zwar nicht mehr so unbeständig, wie besonders die Mesogentiogenin-Fraktion und das Eugentiogenin, es verändert sich aber auch bereits beim Umkristallisieren.

Betrachtet man die UV-Absorptionen, so zeigt es sich, daß Gentiogenin eine dem Tetrahydro-gentiopikrin vergleichbare Absorption hat. Die Dimerisierung muß also unter Aufhebung der zum  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Lactonsystem in Konjugation stehenden Doppelbindung erfolgt sein. Da man bei der Ozonisation Formaldehyd findet, ist die außerhalb der Konjugation stehende Doppelbindung unversehrt im Molekül erhalten.



Abbild. 4. UV-Spektrum des Gentiogenins;  $c = 0,0206$  g/l Methanol;  $\log \epsilon = 4,12$ ,  
 $\lambda_{\text{max}} = 240$  m $\mu$

Es lag nun nahe, an eine Dimerisierung unter Aufhebung einer Doppelbindung in der Art zu denken, wie sie z. B. bei Cumarinen<sup>5</sup>, Lumisteroiden<sup>6</sup> oder der Zimtsäure<sup>7</sup> bereits seit längerem bekannt sind. Eine solche Formulierung (VII) ist jedoch bisher nicht beweisbar, gesichert ist nur, daß die konjugierte Doppelbindung bei der Dimerisierung aufgehoben wird.

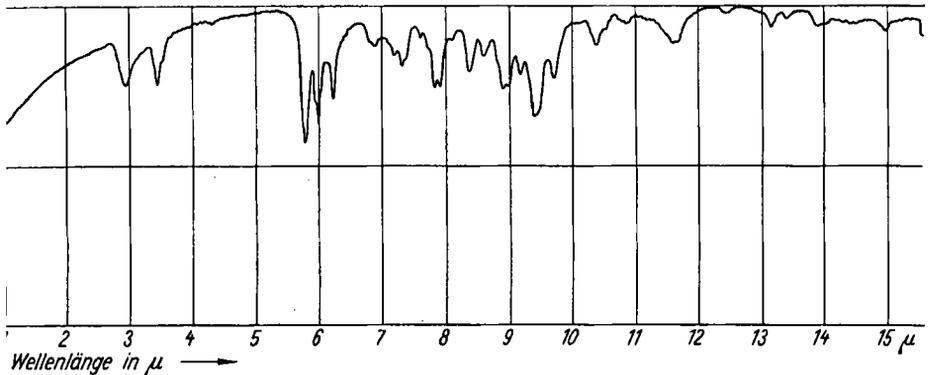
<sup>4</sup>) N. Shephard u. D. M. Simpson, *Quart. Rev. (Chem. Soc. London)* 7, 161 [1953].

<sup>5</sup>) R. Fischer, *Arch. Pharmaz. Ber. deutsch. pharmaz. Ges.* 279, 306 [1941].

<sup>6</sup>) A. Butenandt, L. Karlson-Poschmann, G. Failer, U. Schiedt u. E. Biekert, *Liebigs Ann. Chem.* 575, 123 [1952]; A. Mustafa, *Chem. Rev.* 51, 1 [1952].

<sup>7</sup>) H. Richter-R. Anschütz, *Chemie der Kohlenstoffverbindungen* II 43 [1949].

Im UR-Spektrum des Gentiogenins fehlt eine ausgesprochene OH-Bande. Die im Spektrum auftretende ist durch den Wassergehalt des zum Pressen verwendeten Kaliumbromids vorgetäuscht, was eine Nachmessung in Lösung beweist. Daher muß das Gentiogenin bevorzugt als  $\alpha$ -Ketolacton vorliegen. Dieser Befund wird durch die glatte Reaktion des Gentiogenins mit Phenylhydrazin zum Phenylhydrazon bestätigt.



Abbild. 5. UR-Spektrum des Gentiogenins, in KBr gepreßt

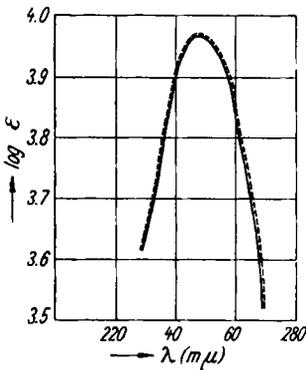
Erhärtert wird diese Konstitution durch die Diskussion der UR-Absorption, die eine isolierte Doppelbindung ( $1669\text{ cm}^{-1}$ ,  $872\text{ cm}^{-1}$ ) im Gentiogenin wahrscheinlich macht.

Betrachtet man nun die Enzymspaltung des Gentiopikrins, so wird sich zunächst das wirkliche Genin bilden, aus dem durch Racemisierung die sehr instabile Mesogentiogeninfraktion entsteht. Unter dem Einfluß des Enzyms lagert sich dieses zum Teil in das stabilere gelbe Eugentiogenin um. Dieses Eugentiogenin ist nun augenscheinlich nicht mehr in der Lage, sich zu dimerisieren, da die sonst reagierende Doppelbindung gewandert ist. Eine weitere Stabilisierungsmöglichkeit ist dann die Dimerisation zum Gentiogenin, die natürlich nur solange möglich ist, als die Doppelbindung des Pyranringes nicht verschoben ist. Aus der Mesogentiogeninfraktion bilden sich also das gelbe Eugentiogenin und das farblose Gentiogenin immer nebeneinander. Dabei ist das Verhältnis der beiden letzten abhängig vom  $p_{\text{H}}$ -Wert; in neutralem, beziehungsweise schwach alkalischem Gebiet überwiegt die Bildung des Gentiogenins, in saurem dagegen die des Eugentiogenins.

Bemerkenswert ist nun folgender experimentelle Befund: Das Gentiopikrin sowie alle Hydrierungsprodukte sind optisch aktiv, dagegen sind die Spaltprodukte, die man durch Enzymolyse vor der Hydrierung erhält, optisch inaktiv. Das bei der Spaltung von Tetrahydro-gentiopikrin entstehende Tetrahydro-protogentiogenin ist dagegen optisch aktiv. Dieser Befund zwingt zu der Annahme, daß sich die Produkte, die bei der Enzymspaltung des Gentiopikrins entstehen, isomerisieren, wogegen eine solche Isomerisierung bei der Enzymspaltung des Tetrahydro-gentiopikrins nicht möglich ist. Das heißt, daß beim Hydrieren des Gentiopikrins der Aglykonkern stabilisiert wird.

Optisch inaktiv:	Optisch aktiv:
Mesogentiogeninfraction	Gentiopikrin
Tetrahydro-mesogentiogenin	Tetrahydro-gentiopikrin
Eugentiogenin	Hexahydro-gentiopikrin
Gentiogenin	Tetrahydro-protogentiogenin
	Hexahydro-protogentiogenin

Diese Annahme stimmt mit den experimentellen Befunden gut überein. Denn das Tetrahydro- und das Hexahydro-protogentiogenin lassen sich in besserer Ausbeute und sehr viel leichter aus den verschieden stark hydrierten Gentiopikrinen darstellen, als Mesogentiogenin, Eugentiogenin und Tanretisches Gentiogenin aus Gentiopikrin selbst. Das aus der Mesogentiogeninfraction durch Hydrieren entstandene Tetrahydro-mesogentiogenin müßte



Abbild. 6. UV-Spektrum des Tetrahydro-mesogentiogenins;  $c = 0.0317 \text{ g/l}$  Methanol;  $\log \epsilon = 3.96$ ,  $\lambda_{\max} = 247.5 \text{ m}\mu$ , und Tetrahydro-protogentiogenins;  $c = 0.0317 \text{ g/l}$  Methanol;  $\log \epsilon = 3.96$ ,  $\lambda_{\max} = 247.5 \text{ m}\mu$  (gestrichelt)

also das Racemat des optisch aktiven Tetrahydro-protogentiogenins sein. Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge konnte dieser Beweis nur auf spektrophotometrischen Wege geführt werden. Die UV-Spektren beider Substanzen erwiesen sich in der Tat als identisch.

Hierdurch war bereits bewiesen, daß das chromophore System in beiden Verbindungen gleichwertig ist. Die UR-Aufnahme des Tetrahydro-protogentiogenins gleicht nun der des Tetrahydro-mesogentiogenins in allen wesentlichen Frequenzen. Lediglich in einzelnen schwachen Banden zeigen sich geringe Unterschiede, so daß unter Berücksichtigung des sehr ähnlichen chemischen Verhaltens und der außerordentlichen Schwierigkeit der Reindarstellung be-

sonders des Tetrahydro-mesogentiogenins bei der großen Übereinstimmung der UR-Spektren die formelmäßige Identität der beiden Tetrahydrogenine als sicher gelten darf. Dieser Rückschluß ist natürlich nur möglich, weil das UR-Spektrum einer optisch aktiven Verbindung mit dem seines Racemates identisch ist.

Eine Deutungsmöglichkeit der Racemisierung ergibt sich durch folgenden experimentellen Befund: Betrachtet man die Stabilisierung des Lactonringes gegenüber Alkali, so zeigt sich, daß der Lactonring der optisch aktiven Verbindungen Gentiopikrin, Tetrahydro-gentiopikrin wie auch Tetrahydro-protogentiogenin sehr viel stabiler ist, als der Lactonring der optisch inaktiven Verbindungen Mesogentiogenin, Eugentiogenin und Tanretisches Gentiogenin. Bei den letzten drei Verbindungen ist der Lactonring so instabil, daß er schon in der Kälte mit alkoholischer Kalilauge bzw. Natriumhydrogencarbonat

titierbar ist. Beim Öffnen des Lactonringes erfolgt dann die Isomerisierung über die Halbacetalgruppierung des  $\alpha$ -Oxy-pyranringes, die im Gleichgewicht mit der offenen Form vorliegt<sup>8)</sup>. Solche Isomerisierungen sind bei Zuckern ja die Regel.

Bei dem in der Natur vorkommenden Patulin, welches dem Gentiopikrin in der Konstitution verwandt ist, findet man ebenfalls nicht die optisch aktive Form, was in gleicher Weise durch Isomerisierung der Halbacetalgruppierung gedeutet wird<sup>2)</sup>. Augenscheinlich ist in den optisch aktiven Verbindungen der Lactonring so stabil, daß die Isomerisierung über die Halbacetalgruppierung nicht möglich ist. Die Isomerisierung des zweiten Asymmetriezentrums im Pyranring ist verständlich unter Annahme einer intermediären Verschiebung der Doppelbindung der Isopropenylgruppe nach der Öffnung des Lactonringes. Die Konstitutionsformel für das Gentiopikrin deutet also zwanglos die sehr schwierigen und verwickelten experimentellen Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse des Gentiopikrins und seiner Hydrierungsprodukte. In Verbindung mit den bereits früher mitgeteilten experimentellen Befunden erscheint die vorgeschlagene Struktur als gesichert.

Herrn Prof. Dr. R. Tschesche danke ich sehr herzlich für sein Interesse, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

#### Beschreibung der Versuche

Gentiogenin (VII): 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 20–50 mg Gentiogenin isolieren lassen. Bei allen Operationen sollte man das Gentiogenin möglichst wenig an der Luft erwärmen, da es sehr leicht zersetzlich ist und sich außerordentlich leicht in rote Schmierer umwandelt, die die Reindarstellung sehr erschweren. Das Gentiogenin 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 bildet sich eine intensivblaue Färbung aus, 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<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (388.4) Ber. C 61.85 H 5.15 Gef. C 61.42 H 5.25 Mol.-Gew. 370 (Rast)

Mesogentiogenin: 1 g Gentiopikrin wird in 20 ccm Wasser gelöst und mit 300 mg Emulsin oder einer anderen Glucosidase, z. B. eines Pilzenzyms aus *Aspergillus oryzae* versetzt. Anschließend stellt man den  $p_H$ -Wert der Lösung mit Hilfe von Phosphatpuffer auf 4 ein und extrahiert mit einem Flüssigkeitsextraktor 25 Stdn. kontinuierlich mit Äther. Der gelb gefärbte Ätherauszug hinterläßt beim Abdampfen ein gelbes Öl, das Asahina als Mesogentiogenin bezeichnet hatte und das primär entstehende Genin des Gentiopikrins darstellt. Das frische Mesogentiogenin ist in Alkohol und Aceton sehr leicht löslich, schwerer in Äther, Essigester und Wasser, schwer in Benzol und unlöslich in Petroläther. Das Polymerisationsprodukt ist in Alkohol und Aceton unlöslich. Mit Eisen(III)-chlorid gibt das Mesogentiogenin in wäßr. wie in alkohol. Lösung eine tiefblaue dauerhafte Färbung, mit Chlorkalk eine tiefgelbe. Gegen Permanganat und Aceton ist es instabil. Die Lösung des Mesogentiogenins in Acetanhydrid färbt sich nach Zugabe von einem Tropfen Schwefelsäure orangerot; die entspr. Lösung des Eugentiogenins

<sup>8)</sup> S. D. Hurd u. W. H. Saunders, J. Amer. chem. Soc. 74, 5324 [1952].

wird violettrot. Eine 10-proz. Lösung des Mesogentiogenins in Alkohol dreht das polarisierte Licht nicht. Mit Phenylhydrazin, Hydroxylamin und Semicarbazid bildet sich kein Kondensationsprodukt.

Tetrahydro-mesogentiogenin (III): Man löst 200 mg Mesogentiogenin in 40 ccm Alkohol und hydriert mit Pd-Kohle als Katalysator, wobei etwa 20 ccm Wasserstoff verbraucht werden. Das Hydrierungsprodukt ist ein Öl, dessen 10-proz. Lösung optisch inaktiv ist. Nach wochenlangem Aufbewahren im Exsiccator kristallisiert die Substanz z.Tl. und bildet dann nach dem Umkristallisieren aus Äther Nadeln vom Schmp. 103°.

$C_{10}H_{14}O_4$  (198.2) Ber. C 60.59 H 7.12 Gef. C 60.35 H 7.33

Einwirkung von Emulsin auf Mesogentiogenin: 400 mg des frisch dargestellten Mesogentiogenins werden mit 400 mg Emulsin, Takadiastase, Luizym oder Pilzzyzymen in 50 ccm Wasser gelöst, auf  $p_H$  5 gebracht und filtriert. Das Ausgefallene zentrifugiert man nach dreitägigem Stehenlassen ab; es zeigt nach dem Umlösen aus Alkohol die beim Gentiogenin beschriebenen Farbreaktionen. Schmp. 175–190°. Auch die UV-Absorption zeigt, daß es sich bei dieser Fraktion um das Gentiogenin handelt. Extrahiert man die wäbr. Phase mit Äther, so erhält man 20 mg einer gelben Substanz vom Schmp. 121–123°. Diese Fraktion zeigt keine Erniedrigungen bei Misch-Schmelzpunktbestimmungen mit Eugentiogenin.

Eugentiogenin (VI): 1 g Gentiopikrin werden in 20 ccm Wasser gelöst und mit Phosphatpuffer auf  $p_H$  4 gebracht. Dazu gibt man eine wäbr. Lösung von 0.3 g Emulsin, Luizym, Takadiastase oder Pilzproteinase und läßt 3 Tage bei 37° stehen. Das Ausgefallene wird abzentrifugiert und aus 80-proz. Methanol umgelöst. Nach mehrmaligem Wiederholen der Operation wird es so kristallin und schmilzt bei 183–185°. Ausb. 10 bis 30 mg. Im Misch-Schmelzpunkt mit Gentiogenin zeigt es keine Erniedrigung und gibt die von Tanret und Asahina bereits beschrieben und erwähnten Farbreaktionen. Das Eugentiogenin ist leicht löslich in Wasser, Alkohol, Äther und Essigester. Es schmeckt und riecht stechend, es gibt nicht die Farbreaktionen, die beim Gentiogenin beschrieben sind. Mit Phenylhydrazin gibt es sofort einen gelben Niederschlag. Eine 10-proz. Lösung des Eugentiogenins in Chloroform dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nicht. In der Kälte ist es mit  $n_{20}$  KOH titrierbar.

$C_{10}H_{10}O_4$  (194.2) Ber. C 61.85 H 5.15

Gef. C 61.80 H 4.06 Mol.-Gew. 198 (Rast), 191 (Tit.)

*p*-Nitrophenylhydrazon des Eugentiogenins: 50 mg Eugentiogenin und 40 mg *p*-Nitrophenylhydrazin werden in 2 ccm Alkohol gelöst und abfiltriert. Beim Stehenlassen scheidet sich ein rotes Pulver aus, das sich zunächst bei 170° zersetzt. Nach mehrmaligem Umfällen steigt der Zersp. auf 210°.

$C_{16}H_{15}O_6N_3 \cdot \frac{1}{2}H_2O$  (345.3) Ber. C 54.24 H 4.52 N 11.86

Gef. C 54.16 H 4.38 N 12.15

Einwirkung von Emulsin auf Eugentiogenin: Man löst 100 mg Eugentiogenin in 15 ccm Wasser und gibt dazu eine zentrifugierte Lösung von 100 mg Emulsin in 10 ccm Wasser, säuert dann mit Phosphatpuffer auf  $p_H$  5 an und läßt 4 Tage bei 37° stehen. Dabei konnte kein Tanretisches Gentiogenin nachgewiesen werden, während aus dem Ätherextrakt etwa 60 mg Eugentiogenin unverändert zurückgewonnen werden konnten.

Zersetzung des Mesogentiogenins durch Barytwasser: Man stellt aus 1 g Gentiopikrin durch die bereits beschriebene Enzymspaltung frisches Mesogentiogenin her, und erhitzt das entstehende Öl mit 20 ccm Barytwasser unter Zusatz von 300 mg Bariumhydroxyd 2 Stdn. unter Durchleiten von Stickstoff am Rückflußkühler. Der ausfallende Niederschlag wird unter Stickstoff abgesaugt, der Niederschlag mit Salzsäure zersetzt und das entweichende Kohlendioxyd volumetrisch gemessen. In einem weiteren Ansatz wurde das entstehende Kohlendioxyd wieder in Barytwasser aufgefangen und als Bariumcarbonat gewogen. In beiden Versuchen erhält man etwa 90% der für 1 Mol. Kohlendioxyd berechneten Menge. Das Filtrat wurde nun der Papierchromatographie für Fett-

säuren unterworfen; dabei findet man an Papier von Schleicher & Schüll, Nr. 2043 a  $R_F$ -Wert = 0.85 (Entwicklung mit Ninhydrinreagenz, Ameisensäure). Die neutrale Lösung reduziert Silbernitrat, und beim Erhitzen entsteht ein Silberspiegel. Wenn man die Lösung mit Phosphorsäure ansäuert und mit Wasserdampf destilliert, so erhält man im Filtrat durch Titration mit 0.05*N*-KOH einen Gehalt an Ameisensäure, der 60–70% der für 1 Mol. ber. Menge entspricht.

Für 1 Mol. Ameisensäure Ber. 41.50 ccm Gef. 23.30, 25.90, 28.73 ccm

Tetrahydro-protogentiogenin (II): 1 g Tetrahydro-gentiopikrin wird in 20 ccm Wasser gelöst und, wie bereits früher beschrieben, enzymatisch gespalten. Nach 3 Tagen extrahiert man erschöpfend mit Äther und erhält so nach dem Umkristallisieren aus Benzol eine krist. Substanz vom Schmp. 98–100°. Ausb. 80 mg. Die Substanz zeigt keine Färbung mit Eisenchlorid in wäßr. Medium, entwickelt jedoch, in Pyridin gelöst, mit Methylmagnesiumjodid Methan. Der Lactonring ist mit Kalilauge in alkohol. Lösung in der Kälte nicht zu titrieren.  $\alpha_D$  in Alkohol: +214°.

$C_{10}H_{14}O_4$  (198.2) Ber. C 60.59 H 7.12 OH 8.58 Gef. C 60.90 H 6.84 OH 9.90, 9.53  
(Zerewitinoff) Mol.-Gew. 205 (Rast), 195 (Tit.)

Mit Phenylhydrazin bildet sich kein faßbares Kondensationsprodukt, mit *p*-Nitrophenylhydrazin dagegen eins vom Schmp. 186–188° (Zers.).

Hexahydro-protogentiogenin (IV): Man hydriert 1 g Gentiopikrin mit Palladium-Tierkohle oder besser mit Platinoxid unter den oben beschriebenen Bedingungen in wäßr. Lösung. Dabei werden in 15 Min. etwa 110 ccm (entspr. 2 Moll. Wasserstoff) aufgenommen. Die Wasserstoffabsorption wird nun ganz langsam und steht nach etwa 20 Stdn. nach weiterer Aufnahme von etwa 65 ccm (entspr. 1 Mol. Wasserstoff) still. Extrahiert man nun die Lösung mit Chloroform und dampft das Lösungsmittel i. Vak. ab, so erhält man einen festen Rückstand. Dieser wird nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äther kristallin und schmilzt dann bei 140°. Ausb. 200 mg. Leicht löslich in Alkohol, Chloroform, schwerer in Äther.  $\alpha_D$  in Alkohol: +161°.

$C_{10}H_{16}O_4$  (200.2) Ber. C 59.97 H 8.06  
Gef. C 59.81 H 7.97 Mol.-Gew. 220 (Rast), 195 (Tit.)

Die Substanz läßt sich in alkohol. Lösung mit Kalilauge nur in der Wärme titrieren. Mit *p*-Nitrophenylhydrazin bildet sich kein Kondensationsprodukt. Mit Phenylhydrazin in wäßr. Lösung entsteht Phenylglucosazon vom Schmp. 205°.

Hydriert man das Tetrahydro-protogentiogenin zum Hexahydro-protogentiogenin, so zeigt das dabei entstehende Produkt keine Schmelzpunktserniedrigung mit dem oben beschriebenen. In Pyridin gelöst, gibt das Hexahydro-protogentiogenin nach Umsetzung mit Methylmagnesiumjodid Methan.

Ber. OH 8.50 Gef. OH 8.81

Oxydiert man Hexahydro-protogentiogenin mit Chromsäure in Eisessig, so bildet sich nicht in einfacher Reaktion das Tetrahydro-protogentiogenin zurück. Das Produkt hat nach Zerewitinoff keinen aktiven Wasserstoff mehr, sein Lactonring ist im Gegensatz zu dem des Tetrahydro-protogentiogenins bereits in kalter alkoholischer Lösung mit Kalilauge titrierbar. Über die Konstitution des bei 93–94° schmelzenden Stoffes lassen sich noch keine Angaben machen.  $\alpha_D$ : –30.35° in Alkohol.

$C_{10}H_{14}O_4$  (198.2) Ber. C 60.59 H 7.12 Gef. C 60.21 H 6.93 Mol.-Gew. 196 (Rast)