

107. Friedhelm Korte: Amarogentin, ein neuer Bitterstoff aus Gentianaceen. Charakteristische Pflanzeninhaltsstoffe, IX. Mittel.¹⁾

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

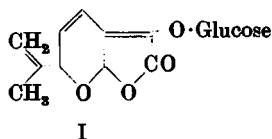
(Eingegangen am 18. Februar 1955)

Das Amarogentin, dessen Bitterkeit noch in einer Verdünnung von 1:58000000 deutlich wahrnehmbar ist, wurde aus Gentianaceen rein dargestellt. Es kommt besonders in Swertia- und Gentiana-Arten vor und entsteht nicht bei der Fermentation. Die Verbindung enthält 1 Mol. Glucose, die Analyse entspricht der Formel $C_{32}H_{38}O_{16}$. Das aus Sabbatia-Arten isolierte Sabbatin wird als Gentiopikrin identifiziert.

Nach der Konstitutionsaufklärung des Gentiopikrins²⁾ und dem Nachweis, daß diese Verbindung in allen Gentianaceen vorkommt³⁾ und mit Erytaurin, Gentiamarin und Swertiamarin identisch ist⁴⁾, wurde versucht, das Gentiopikrin (I) quantitativ zu erfassen.

Die Bestimmung gelang durch Kolorimetrierung des Farbstoffes, der in alkalischem Medium durch Reaktion des Gentiopikrins mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid entsteht. Der Vergleich der auf diese Weise in den einzelnen Pflanzen ermittelten Konzentrationen mit den entsprechenden Bitterwerten ließ erkennen, daß neben dem Gentiopikrin noch ein weiterer Bitterstoff in Gentianaceen vorkommen muß. Er wurde Amarogentin genannt und läßt sich papierchromatographisch vom Gentiopikrin abtrennen und unter der UV-Lampe durch Besprühen mit einer 20-proz. Antimontrichlorid-Lösung in Chloroform sichtbar machen. Wichtig war der Nachweis, daß Amarogentin bereits in der frischen Pflanze enthalten ist und nicht bei der Trocknung oder Fermentation entsteht⁵⁾. Der neue Bitterstoff ist in einer Verdünnung von 1:58000000 noch deutlich zu testen und damit um mehr als eine Zehnerpotenz bitterer als Brucin, das bisher als wirksamste Verbindung galt.

Da die beiden Bitterstoffe sehr ähnliche Löslichkeitseigenschaften haben, und beide beim Lösen in n_{10} NaOH und sofortigem Neutralisieren ihren bitteren Geschmack verlieren, mußte die Reinheit des Gentiopikrins nachgeprüft und gezeigt werden, daß nicht das Amarogentin als Verunreinigung für seinen bitteren Geschmack verantwortlich ist. Der Bitterwert des Gentiopikrins würde bereits durch einen 0.02-proz. Amarogentin-Gehalt erklärbar sein. Es ließ sich aber durch sorgfältige Chromatographie an Cellulosepulver, Rein-



¹⁾ VIII. Mittel.: F. Korte u. I. Korte, Z. Naturforsch., i. Druck.

²⁾ F. Korte, Chem. Ber. 87, 769 [1954].

³⁾ F. Korte, Z. Naturforsch. 9b, 354 [1954].

⁴⁾ F. Korte, Chem. Ber. 87, 1357 [1954].

⁵⁾ M. K. Messmer, Dissertat. Eidgen. Technische Hochschule Zürich, 1941.

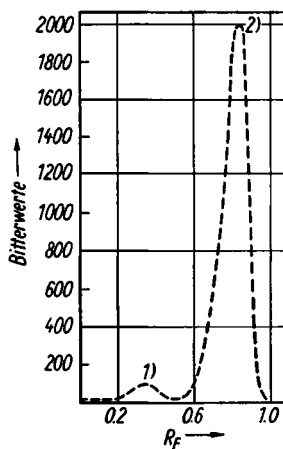
darstellung des bitteren Tetraacetates und zehnmaliger Umkristallisation des analysenreinen Gentiopikrins eine eindeutige Konstanz des Bitterwertes 1:12000 erzielen.

Die Untersuchung der rohen Pflanzenextrakte ergab die in der folgenden Darstellung angegebene Verteilung, wobei sich durch Chromatographie wie auch durch Isolierung der Reinsubstanz zeigen ließ, daß das Amarogentin besonders in der Gattung *Swertia* (*Chirettakraut*) und *Gentiana* (*Enzian*) vorkommt, während *Centaurium* (*Tausendgüldenkraut*) nur sehr wenig davon enthält*).

Da von den zur Verfügung stehenden handelsüblichen Drogen das *Chirettakraut* (*Swertia chirata* Buch. Ham.) und *Gentiana lutea* den höchsten Bitterwert haben, wurden diese zunächst zur Isolierung des Amarogentins herangezogen**).

Aus *Ophelia chirata* Griesbach waren bereits früher von F. Flückiger und H. Höhn⁶⁾ Opheliasäure und eine bittere Substanz, das Chiratin, isoliert worden. Später beschrieben D. N. Majumdar und P. C. Guha⁷⁾ eine Auftrennung des gelben amorphen Chiratins in zwei Komponenten, ein braunes und ein gelbgrünes Pulver. Beide Produkte waren stark bitter und konnten nicht weiter gereinigt werden. Da sie jedoch im Gegensatz zum reinen Amarogentin in Alkohol und Aceton unlöslich waren, sind diese Produkte sicher nicht einheitlich gewesen.

Die Reindarstellung des Amarogentins gelang durch sorgfältige Chromatographie an Cellulosepulver (Whatman) nach dem im Versuchsteil beschriebenen Verfahren. Als Elutionsmittel wurden dabei wassergesättigtes Butanol, wassergesättigter Amylalkohol oder Wasser benutzt, wobei die Anreicherung durch den Bitterwert kontrolliert wurde⁸⁾. Die so erhaltene farblose Substanz konnte bisher nicht in einheitlich ausgeprägten Kristallen erhalten werden. Da jedoch die Analysen, die UV- und IR-Spektren der nach verschiedenen Aufarbeitungsmethoden erhaltenen reinsten Produkte ebenso wie deren Schmelzpunkte identisch waren, kann kein Zweifel an der Einheitlichkeit der Verbindung bestehen.



Abbild. 1. Verteilung der Bitterstoffe in *Swertia-chirata*-Droge. 1) Gentiopikrin, 2) Amarogentin. Ordinate: Bitterwerte, die bei der Elution mit Methanol erhalten wurden. Abszisse: R_F -Wert der eluierten Zone im Papierchromatogramm (in Butanol-Wasser)

*) Die Frischpflanzen entstammen dem Botanischen Garten in Hamburg. Hrn. Prof. Dr. W. Mevius möchte ich auch an dieser Stelle sehr für die freundliche Überlassung danken.

***) Hrn. Dr. H. E. Klie, Hamburg, möchte ich auch an dieser Stelle herzlich für die Aufarbeitung von 50 kg *Gentiana-lutea*-Trockendroge danken.

⁶⁾ F. Flückiger u. H. Höhn, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 189, 229, 213 [1869]; H. Höhn, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. ii, 129, 213 [1869].

⁷⁾ J. Indian Inst. Sci., A 16, 29 [1933].

⁸⁾ R. Wasicky, H. Stern u. E. Zimet, Heil- u. Gewürz-Pflanzen 16, 71 [1934].

Bei der Hydrolyse des Amarogentins wurde 1 Mol. Glucose papierchromatographisch nachgewiesen. Die Verbindung ist gegenüber Säuren stabiler als gegen Alkali. Sie verliert ihre Bitterkeit bereits beim Auflösen in $n/_{10}$ NaOH. Elementar-Analysen und Mol.-Gew.-Bestimmungen ergeben die Summenformel $C_{32}H_{38}O_{16}$. Das UV-Spektrum zeigt in Methanol 3 Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 225 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4.54$; $\lambda_{\max} = 265 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4.18$; $\lambda_{\max} = 305 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3.88$. Die Absorption bei $225 \text{ m}\mu$ deutet ebenso wie das IR-Spektrum auf eine α, β -ungesättigte Lactongruppierung hin.

Außer dem Amarogentin und dem Gentiopikrin werden keine weiteren Bitterstoffe in Gentianaceen gefunden.

Aus *Sabbatia Elliotii* Steud. und *Sabbatia angularis* Pursh. wurde die Isolierung des Sabbatins⁹⁾ bzw. Erythrocentaurins beschrieben¹⁰⁾. Das Erythrocentaurin war bereits früher als Gentiopikrin erkannt worden. Durch Papierchromatographie wie auch Isolierung des Gentiopikrins als Tetraacetat nach bereits beschriebenem Verfahren⁴⁾ ließ sich nachweisen, daß Sabbatin mit Gentiopikrin identisch ist. Daneben konnte auch aus diesen Pflanzen Amarogentin isoliert werden.

Hrn. cand. chem. G. Lipp möchte ich auch an dieser Stelle für seine wertvolle Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung einer Sachbeihilfe danken.

Beschreibung der Versuche

Isolierung des Amarogentins

Das Verfahren wird am Beispiel der *Swertia chirata* (Chirettakraut) beschrieben, eignet sich aber in gleicher Weise für die Aufarbeitung anderer Gentianaceen. 10 kg handelsübliches Chirettakraut (*Herba Chirettae*) werden 3mal mit soviel siedendem Methanol übergossen, daß die Droge eben bedeckt ist, und nach je 1 Stde. abgepreßt. Die bitteren Komponenten finden sich dann vollständig im Methanol. Nach Abdampfen i. Vak. erhält man eine grünbraune klebrige Masse. Man nimmt mit soviel Wasser auf, daß eine möglichst konzentrierte Lösung entsteht und schüttelt 2mal mit der gleichen Menge Chloroform zur Entfernung des Chlorophylls aus. Die Chloroformextrakte sind nur schwach bitter. Anschließend wird der Bitterstoff mindestens 30mal mit je 500 ccm wassergesättigtem Essigester extrahiert. Der extrahierte Sirup hat nur noch einen Bitterwert von 1:3000. Nach Abdampfen des Essigesters i. Vak. erhält man etwa 100 g eines gelbbraunen pulvrigen Rückstandes mit dem Bitterwert 1:2000000. Bei allen Destillationen soll die Wasserbadtemperatur 50° nicht übersteigen. Aus diesem Rückstand läßt sich nach dem früher bereits beschriebenen Verfahren²⁾ Gentiopikrin als Acetat in kleinerer Menge isolieren.

Der Rückstand wird in Methanol gelöst, mit 500 g Al_2O_3 Woelm (neutral) angerührt und i. Vak. zur Trockene eingedampft. Man schlämmt je eine Hälfte des entstandenen Pulvers mit Chloroform auf eine Säule, in die vorher $2\frac{1}{2}$ kg Al_2O_3 Woelm, neutral, mit Chloroform eingebracht worden sind. Beim Eluieren mit Chloroform/Methanol 9:1 erhält man nicht bittere Farbstoffe. Man chromatographiert in der üblichen Weise weiter und erhält mit Methanol/Wasser 1:1 eine Fraktion, die das Gentiopikrin wie auch das Amarogentin enthält (etwa 3–5 g). Zur Trennung des Amarogentins vom Gentiopikrin wird an Cellulosepulver (Whatman) chromatographiert. Bei Benutzung von wassergesättigtem

⁹⁾ H. Hunter, Amer. J. Pharmacy Sci. support. publ. Health [4] 1, 207 [1871]; C. Hartwich, Neue Arzneidrogen.

¹⁰⁾ E. Merck, Index, 6. Aufl., 456 (1929), wissenschaftl. Abhandl. Nr. 26, 119.

Butanol als Elutionsmittel hat das Gentiopikrin den R_F -Wert 0.38, das Amarogentin 0.80, bei wassergesättigtem Amylalkohol hat Gentiopikrin keine Laufstrecke, während Amarogentin praktisch mit der Lösungsmittelfront durchläuft, so daß mit dem letzten Lösungsmittel eine vollständige Trennung erreicht werden kann. Man erhält so etwa 2 g rohes Amarogentin, welches auf Grund des Farbtestes mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid frei von Gentiopikrin ist. Das Amarogentin zeigt mit diesem Reagens keine Reaktion. Es läßt sich dagegen nach Besprühen des Papiers mit einer 20-proz. $SbCl_5$ -Lösung in Chloroform und 2 Min. langem Erhitzen auf 100° durch Fluorescenz unter der UV-Lampe sichtbar machen. Dabei lassen sich noch 20 γ Amarogentin nachweisen. Man wiederholt die Chromatographie an Cellulosepulver unter Benutzung von wassergesättigtem Butanol als Elutionsmittel. Nimmt man reines Wasser, ist der R_F -Wert 0.61. Beim Ablösen von der Säule erhält man ein Rohprodukt, dessen Bitterwert bei 1:3000000 bis 1:4000000 liegt (1 g). Dieses Rohprodukt wird mit Chloroform ausgekocht, wobei die farbigen Anteile in Lösung gehen und entfernt werden. Nach mehrmaligem Umfällen aus absol. Dioxan oder Tetrahydrofuran mit Cyclohexan, Benzol oder Petroläther erhält man das reine, farblose Amarogentin vom Schmp. $178-180^\circ$.

Das Amarogentin ist unlöslich in Petroläther, Äther, Cyclohexan und Chloroform, schwer löslich in Benzol und Wasser, leicht löslich in absol. Dioxan, Aceton und Tetrahydrofuran, ferner in Äthanol und Methanol. $[\alpha]_D^{20} : -70^\circ$ (Methanol).

Analysen der aus verschiedenen Ansätzen (a-d) erhaltenen Produkte:

$C_{32}H_{38}O_{16}$ (678.6)	Ber.	C 56.63	H 5.64	O 37.72	
	Gef. a)	C 56.79	H 5.53	O 37.68	Mol.-Gew. 685
	b)	C 56.81	H 5.86	O 37.33	Mol.-Gew. 662
	c)	C 57.03	H 5.40	O 37.57	Mol.-Gew. 699
	d)	C 56.82	H 5.62	O 37.66	Mol.-Gew. 680

} Rast

Bestimmung des Amarogentins in Drogen oder Frischpflanzen

Das zu untersuchende Material wird fein zerteilt im Soxhlet mit Methanol extrahiert, wobei nach 10 Überläufen die Extraktion beendet ist. Nach Abdampfen des Methanols i. Vak. nimmt man mit Wasser auf und schüttelt das evtl. vorhandene Chlorophyll mit Chloroform aus. Man trägt von der konz. wäßrigen Lösung auf der Startlinie eines handelsüblichen Bogens Schleicher & Schüll, 2043 a Mgl, nebeneinander insgesamt 50-100 mg Substanz auf, entwickelt mit wassergesättigtem Butanol in üblicher Weise und schneidet das Chromatogramm parallel zur Startlinie in 20 gleiche Streifen. Die einzelnen Streifen werden mit Methanol im Soxhlet extrahiert und sowohl das Gewicht wie auch der Bitterwert jeder Fraktion nach dem Eindampfen i. Vak. bestimmt. Man erhält so Abbild. 1. entsprechende Diagramme. Durch Anfärben mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid läßt sich das Gentiopikrin und durch Sichtbarmachen mit $SbCl_5$ das Amarogentin quantitativ bestimmen. Bei der Ermittlung des Bitterwertes durch Verdünnungsreihen sind die üblichen Vorsichtsmaßregeln zu beachten, insbesondere sollen die Lösungen nur bei gleicher Temperatur verglichen werden.