

zweimal mit je 3 ccm Methanol gewaschen und i. Vak. über konz. H_2SO_4 getrocknet. Ausb. 22.0–22.2 mg (97% d. Th.).

λ_{\max} 214 $m\mu$, $lg \epsilon$ 4.20; λ_{\max} 274 $m\mu$, $lg \epsilon$ 3.92¹⁹).

Xanthin-[5-¹⁴C]: 10.0 mg Guanin-[5-¹⁴C] werden in 1.0 ccm 2n H_2SO_4 gelöst und bei 80–90° im Verlaufe von 30 Min. mit 10 mg $NaNO_2$ in 2 ccm Wasser versetzt. Durch Zugabe von wenig 2n NaOH wird ausgefallenes Xanthin in Lösung gebracht. Bei 90° wird nun mit 2n Essigsäure schwach angesäuert und langsam abgekühlt. Das Xanthin scheidet sich kristallin und nahezu farblos ab. Nach Stehenlassen bei 0° über Nacht, Abzentrifugieren und Waschen, wie bei Guanin angegeben, erhält man 9.4–9.6 mg (94 bis 96% d. Th.).

λ_{\max} 214 $m\mu$, $lg \epsilon$ 4.30; λ_{\max} 283 $m\mu$, $lg \epsilon$ 3.96¹⁹).

Alle UV-Spektren wurden im Bereich von 190–500 $m\mu$ mit dem Gitterspektrophotometer Optica gemessen. Lösungsmittel: n_{10} NaOH.

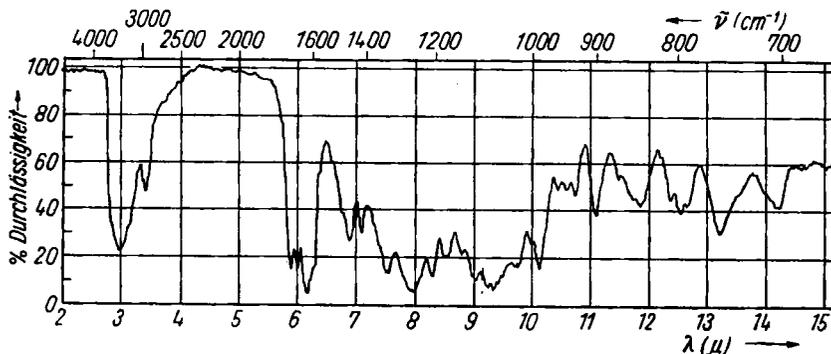
341. Friedhelm Korte und Hans-Gerd Schicke: Zur chemischen Klassifizierung von Pflanzen, XII. Mitteil.¹⁾: Zur Kenntnis des Amarogentins

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn]

(Eingegangen am 5. Juli 1956)

Amarogentin wird in 0.05% Ausbeute aus handelsüblichem Chirettakraut isoliert. Die Summenformel für das bittere Glucosid ist $C_{30}H_{24}O_{10}$. Die Enzym- und Säurespaltung verläuft uneinheitlich, das Molekül enthält keine OCH_3 -Gruppe, bei der Lactontitration werden 2 Moll. NaOH verbraucht. Die optisch nachgewiesene Doppelbindung ist schwer hydrierbar. Aus dem nicht bitteren Amarogentin-tetraacetat läßt sich der Bitterstoff zurückgewinnen.

Kürzlich wurde über die Isolierung des Bitterstoffes Amarogentin aus Gentianaceen berichtet²⁾. Da die Substanz nicht kristallisiert, war es notwendig, ihre Einheitlichkeit zu prüfen. Dazu wurde sie mehrfach nach verschiedenen Verfahren gereinigt, wobei sich ergab, daß die erhaltenen Produkte in allen chemischen und physikalischen Eigenschaften identisch sind. Lage und Intensitätsverhältnis der einzelnen Banden im IR (Abbild. 1) stimmen überein.



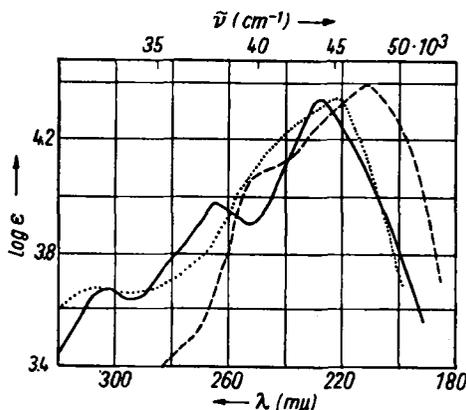
Abbild. 1. IR-Spektrum von Amarogentin, in KBr gepreßt

¹⁹) S. F. Mason, J. chem. Soc. [London] 1954, 2071.

¹⁾ XI. Mitteil.: F. Korte, Chem. Ber. 88, 1627 [1955].

²⁾ F. Korte, Chem. Ber. 88, 704 [1955].

Acetyliert man das Amarogentin mit Acetanhydrid in Pyridin, so bildet sich ein geschmackloses Tetraacetat, welches nach längerem Verweilen auf der Zunge durch Verseifung wieder bitter wird. Auch das Tetraacetat kristallisiert nicht. Durch sorgsame Chromatographie an Cellulosepulver Whatman und Umfällung läßt es sich jedoch analysenrein gewinnen. Auf dem Papierchromatogramm ist es im Gegensatz zum Amarogentin mit SbCl_3 nicht anzu färben. Die Sichtbarmachung gelingt jedoch leicht durch Bestreichen mit konz. Schwefelsäure.



Abbild. 2. UV-Spektrum des Amarogentins in Methanol, $c = 0.0240 \text{ g/l}$ (—), in $n/_{10}$ NaOH, $c = 0.040 \text{ g/l}$ (.....), und des Amarogentin-tetraacetates in Methanol, $c = 0.0250 \text{ g/l}$ (-----)

Bei der Verseifung mit KHCO_3 in Methanol³⁾ und mit NaOCH_3 ⁴⁾ wird Amarogentin zurückgewonnen. Dadurch ist nachgewiesen, daß sich das Grundskelett bei der Acetylierung nicht verändert, obwohl das Tetraacetat ein anderes UV-Spektrum als das Amarogentin hat (Abbild. 2).

Dieser Befund spricht dafür, daß die Glucose in der Nähe des chromophoren Systems mit dem Genin verknüpft ist, wie es beim Gentiopikrin, dem anderen Bitterstoff der Gentianaceen, bereits gezeigt wurde⁵⁾. Das Tetraacetat läßt sich nur schwierig und in schlechterer Ausbeute rein erhalten, als das Amarogentin.

Nach dem im Versuchsteil angegebenen Verfahren erhält man aus 10 kg handelsüblichem Chirettakraut (*Herba Chirettae*, *Swertia chirata*) 0.5 g reines Amarogentin. Es enthält keine Carboxylgruppe, und bei der Lactontitration werden 2 Moll. NaOH verbraucht. Eine $-\text{OCH}_3$ -Gruppe ist nicht nachweisbar. Beim Lösen in $n/5$ wäßrigem NaOH geht die Bitterkeit sofort verloren. (Im Pflanzenrohextrakt ist das Amarogentin gegenüber NaOH sehr viel stabiler.) Während es beim Ansäuern in der Kälte zurückgewonnen werden kann, verändert es sich beim Erhitzen in Analogie zum Gentiopikrin. Alle bisher er-

³⁾ J. Schmutz u. T. Reichstein, *Pharmac. Acta Helvetiae* **22**, 369 [1947].

⁴⁾ G. Zemplén u. D. Kiss, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **60**, 165 [1927].

⁵⁾ F. Korte, *Chem. Ber.* **87**, 512 [1954].

haltenen Verbrennungswerte stimmen gut überein, obwohl die Produkte nicht kristallisiert sind. Durch mehrfache Darstellung des Amarogentins und dessen Tetraacetates wird die Summenformel $C_{20}H_{24}O_{10}$ gesichert. Die früher mitgeteilte Molekulargewichtsbestimmung stellt sich als Fehlanalyse heraus. Vom Gentiopikrin $C_{16}H_{20}O_9$ unterscheidet sich der neue Bitterstoff daher durch den Mehrgehalt von C_4H_4O . Nach Berücksichtigung der Glucose ergibt sich für das Genin des Amarogentins die Summenformel $C_{14}H_{14}O_6$. Bei der Mikrohydrierung mit PtO_2 in Eisessig wird nur sehr langsam Wasserstoff aufgenommen, was der Hydrierung der α,β -ungesättigten Lactongruppierung des Gentiopikrins entspricht. Neben der α,β -ungesättigten Keto- oder Lactongruppierung enthält das Molekül also keine weitere Doppelbindung.

Eine andere Analogie zum Gentiopikrin zeigt sich bei der Glykosidspaltung. Die Säure- wie auch die Enzymspaltung verläuft uneinheitlich und führt zu mehreren Produkten. Es konnte zwar eine zuckerfreie Komponente (Schmp. 183°) isoliert werden, deren UV-Spektrum mit dem des Amarogentins weitgehend übereinstimmt. Diese Verbindung soll jedoch nach den Erfahrungen an Gentiopikrin⁶⁾ noch nicht als das Genin angesprochen werden, da sie nur in 7-proz. Ausbeute isoliert wurde.

Die bisherige pharmakologische Prüfung des Amarogentins zeigt, daß es für die bekannten Wirkungen von einigen offizinellen Gentianaceen verantwortlich ist. Trotz der hohen Nachweisgrenze durch den Geschmack (Grenzverdünnung 1:6·10⁷) zeigt sich dagegen keine Wirksamkeit gegen Mottenraupen⁷⁾.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft auch an dieser Stelle für die Unterstützung der Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Isolierung des Amarogentins: 100 kg Chirettakraut (*Swertiu chirata*) werden mit Petroläther und Methanol erschöpfend extrahiert, der Methanolextrakt i. Vak. (Badtemperatur 50°) eingedampft. Es hinterbleibt ein chlorophyllhaltiger Sirup, der mit Wasser/Methanol 4:1 ausgezogen wird. Der Rückstand ist nach dem Durchkneten frei von Bitterstoff. Die Lösung wird erneut i. Vak. bei 50° eingedampft. Der entstandene Sirup wird mit Methanol ($\frac{1}{3}$ seines Volumens) versetzt und mit Petroläther ausgeschüttelt. Nach Eindampfen der Methanollösung i. Vak. wird noch dreimal mit Chloroform extrahiert, um das restliche Chlorophyll zu beseitigen. Es hinterbleiben 11 kg Sirup, der in Portionen von 1 kg weiter aufgearbeitet wird*). Man extrahiert den Sirup mit wassergesättigtem Essigester mit Hilfe eines Vibromischers. Nach 15 Extraktionen mit $\frac{1}{3}$ des Volumens an Essigester ist alles Amarogentin ausgeschüttelt. Nach Eindampfen des Essigesters i. Vak. bei 50° hinterbleiben 100 g eines schaumigen Produktes. Dieses wird in Methanol gelöst und auf der 6-fachen Menge Al_2O_3 Woelm neutral aufgezogen. Nach dem Abdampfen des Methanols schlämmt man das völlig trockene Pulver mit reinem Methanol in eine Säule ein, die mit der 30fachen Menge Al_2O_3 Woelm neutral gefüllt ist. Bei der Elution mit Chloroform/Methanol 9:1 werden gefärbte nicht bittere Anteile abgelöst, mit Methanol/Wasser 1:1 Amarogentin. Nach dem Eindampfen i. Vak. wird das Rohprodukt zur Entfernung des Gentiopikrins an Cellulosepulver Whatman chromatographiert, Lösungsmittel: wassergesättigter Amylalkohol. R_F -Wert: 0.9–1.

⁶⁾ F. Korte, Chem. Ber. 87, 769 [1954].

⁷⁾ Wir verdanken die Prüfung Herrn Prof. Dr. O. Bayer, Leverkusen.

*) Der Chemischen Fabrik Promonta, Hamburg, danken wir für die Extraktion von 100 kg Chirettakraut.

Die bittere, gentiopikrinfreie Fraktion wird erneut an Cellulosepulver mit wasser-gesättigtem Butanol chromatographiert. R_F -Wert: 0.8. Dabei werden Fraktionen von 10 ccm aufgefangen und der Gehalt an Amarogentin durch den Bitterwert bestimmt. Nach dem Eindampfen i. Vak. werden aus 1 kg Rohextrakt 1.2 g eines Rohproduktes erhalten, das etwa 50% Amarogentin enthält. Beim Aufnehmen mit Methanol und Eindampfen i. Vak. hinterbleibt ein gelber Schaum, der mehrfach mit Chloroform ausgekocht wird. Man erhält so 0.8 g eines Pulvers, das durch fraktioniertes Umfällen aus wasserfreiem Aceton mit absol. Benzol 0.5 g Amarogentin, Schmp. 168°, ergibt. Zur Analyse wurde dieses Produkt noch mehrfach umgefällt und die fortschreitende Reinigung durch Schmelzpunkt, Drehung, UV-Spektrum und Bitterwert kontrolliert.

Das Amarogentin ist unlöslich in Äther, Petroläther, Chloroform und Cyclohexan, schwer löslich in Benzol und Wasser, leicht löslich in Dioxan, Aceton, Äthanol, Methanol und Tetrahydrofuran. Schmp. 174°. Bitterwert $1:6 \cdot 10^7$; $[\alpha]_D^{20}$: -67° , in Methanol. Zur Analyse wurde die Substanz 10 Stdn. bei 120° i. Vak. getrocknet.

$C_{20}H_{24}O_{10}$ (424.4) Ber. C 56.60 H 5.70 O 37.70

Gef. C 56.84 H 5.86 O 37.30 Mol.-Gew. 447 (n. Rast)

UV-Absorption in CH_3OH : λ_{max} 228 $m\mu$, $\log \epsilon$ 4.35; 266 $m\mu$, $\log \epsilon$ 3.97; 304 $m\mu$, $\log \epsilon$ 3.67; in n_{10} NaOH: λ_{max} 222 $m\mu$, $\log \epsilon$ 4.35; 304 $m\mu$, $\log \epsilon$ 3.67.

Mikrohydrierung des Amarogentins: 5 mg Amarogentin werden in 4 ccm Eisessig mit PtO_2 als Katalysator bei Zimmertemperatur geschüttelt. Innerhalb von 2 Stdn. findet nur eine geringfügige Aufnahme von Wasserstoff statt.

Amarogentin-tetraacetat: 5.15 g rohes Amarogentin, Schmp. 166–168°, geben in 30 ccm absol. Pyridin eine braunrote Lösung, welche mit 80 ccm frisch destilliertem Acetanhydrid versetzt und 3 Tage bei 40° stehengelassen wird. Nach Eindampfen i. Vak. bei einer Badtemperatur von 50° wird zur Entfernung des Anhydrids mehrfach mit Wasser versetzt, wobei sich ein dunkler Sirup an den Wänden absetzt. Nach jeweils 10 Min. langem Stehenlassen wird das Wasser abgegossen. Der Rückstand wird in Methanol gelöst und i. Vak. eingengt. Nach Wiederholung dieser Operation mit Methanol und zweimal mit Benzol ist der Sirup völlig vom Lösungsmittel befreit. Es fällt ein teilweise schaumiges Produkt an mit einem Bitterwert von etwa $1:2 \cdot 10^5 - 1:25 \cdot 10^4$, während das Rohamarogentin einen solchen von $1:1 \cdot 10^7$ hat. Von Al_2O_3 Woelm neutral läßt sich das Acetat nicht ablösen, es kann jedoch mit Benzol an 100 g Cellulosepulver Whatman chromatographiert werden. Ein großer Teil der schwarzen Produkte bleibt auf der Säule haften. Die gefärbte Benzol-Lösung wird i. Vak. eingedampft, es hinterbleiben 4 g eines gelbbraunen Sirups. Aus dem Sirup läßt sich durch häufiges fraktioniertes Umfällen aus Chloroform mit Cyclohexan ein farbloses Pulver erhalten, welches ebenfalls, jedoch nur schwierig mit Wasser aus Methanol gefällt werden kann. Das Acetat ist weitgehend rein, wenn es, von Schmierstoffen befreit, in flockiger Form anfällt. Das Pulver ist nicht mehr bitter. Ausb. 0.9 g. Kontrolle der Anreicherung durch Bestimmung des Bitterwertes, Schmelzpunktes und UV-Spektren. Das Acetat ist leicht löslich in Methanol, Chloroform, Benzol, Dioxan und Aceton, schwer löslich in Wasser, Petroläther und Cyclohexan. Schmp. 89–92°. Zur Analyse wurde 10 Stdn. i. Vak. bei 70° getrocknet.

$C_{28}H_{32}O_{14}$ (592.5) Ber. C 56.75 H 5.44 O 37.80 Acetyl 29.1

Gef. C 56.87 H 5.25 O 37.88 Acetyl 30.5 Mol.-Gew. 598 (n. Rast)

UV-Absorption in Methanol: λ_{max} 212 $m\mu$, $\log \epsilon$ 4.39.

Papierchromatographie des Acetates: Einige mg des Acetates werden in 1 ccm Methanol gelöst und ein Tropfen dieser Lösung auf das Papier (Schleicher & Schüll, 2043a) gebracht. Mit wassergesättigtem Butanol läuft das Acetat fast mit der Lösungsmittelfront durch. Anfärbung durch Bestreichen mit konz. Schwefelsäure. Braune Flecken, R_F -Wert 0.90.

Verseifung des Acetates: 260 mg des rohen, an Cellulosepulver chromatographierten Acetates (Bitterwert: $1:250000$), werden in 60 ccm Methanol gelöst, mit 260 mg $KHCO_3$, das in 15 ccm Wasser gelöst ist, versetzt und 10 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Lösung, aus der sich inzwischen geringe Mengen eines farblosen

Produktes ausgeschieden haben, wird i. Vak. eingedampft. Zur Entfernung etwa vorhandener anorganischer Produkte wird mit 150 ccm Wasser aufgenommen. Bis auf eine geringe Menge eines bräunlich gefärbten Produktes geht nun die gesamte Substanz in Lösung. Hieraus wird der Bitterstoff 5mal mit je 50 ccm Essigester ausgeschüttelt. Die gefärbten Anteile gehen nur in geringer Menge in den Essigester, der stark bitter ist. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels hinterbleibt ein schwach gefärbter Schaum, aus dem das Amarogentin isoliert werden kann.

Beim Lösen dieses Schaumes in Aceton und anschließender Fällung mit Benzol fällt der Bitterstoff sofort in flockiger Form aus. Nach mehrfachem Umfällen erhält man Amarogentin vom Schmp. 168–170°, Ausb. 50 mg. Durch weiteres Umfällen erhält man 40–45 mg Amarogentin mit dem Schmp. 170–172°. Die Identität mit Amarogentin wird durch Misch-Schmp., IR-Spektrum und Bitterwert ($1:6 \cdot 10^7$) bestätigt.

Spaltung des Amarogentin-tetraacetates: 360 mg Acetatsirup werden in 10 ccm Methanol gelöst und mit einer katalytischen Menge CH_3ONa versetzt. Nach 40stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur wird mit Essigsäure neutralisiert und i. Vak. eingedampft. Der in Chloroform unlösliche Sirup wird in wenig Methanol gelöst und mit 150 ccm Wasser versetzt. Nach 5 Extraktionen mit je 50 ccm Essigester ist die gelb gefärbte wäßrige Lösung nicht mehr bitter. Nach dem Eindampfen des Essigesters wird aus dem verbleibenden Sirup mit Benzol aus Acetonlösung das Amarogentin gefällt. Schmp. 166–168°. Nach weiterem mehrfachem Umfällen aus Dioxan mit Cyclohexan war der Schmp. 169–171°. Ausb. 30 mg; Bitterwert $1:6 \cdot 10^7$.

Titration des Amarogentins: 18.9 mg Amarogentin werden mit 10 ccm $n/10$ NaOH versetzt, wobei sich die Substanz auflöst. Nach 2 Stdn. wird mit $n/10$ HCl zurücktitriert. 2 Moll. NaOH pro 1 Mol. Amarogentin werden verbraucht. Konduktometrisch und mit Phenolphthalein als Indikator werden gleiche Ergebnisse erzielt.

Stabilität: Amarogentin ist gegenüber $n/5$ NaOH instabil, gegenüber $n/10$ NaOH einige Minuten beständig. Beim Erhitzen mit $2n$ HCl verliert es die Bitterkeit nur langsam. Nach 6 Stdn. sind etwa 60% hydrolysiert. 30% können zurückgewonnen werden.

Alle Spektren wurden im Bereich von 190–400 μ mit dem Gitterspektrophotometer Optica gemessen.

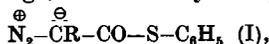
342. Theodor Wieland und Heinz Peil¹⁾: Umsetzungsprodukte aliphatischer Diazoverbindungen mit Ammoniak

[Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.]

(Eingegangen am 7. Juli 1956)

Durch Anwendung der mikropräparativen Papierelektrophorese wird gezeigt, daß sich Diazoessigester mit Ammoniumhydroxyd außer zu Diazoacetamid auch zu Glycinamid, Glycin, Asparaginsäure und deren Diamid umsetzt. Diazomethan liefert erwartungsgemäß Mono- und Di-methylamin und in Gegenwart von Luft Colamin, außerdem weitere bisher nicht aufgeklärte Amine. Die Colaminbildung hängt mit der Anwesenheit von Formaldehyd zusammen, der aus Diazomethan durch Autoxydation entsteht.

Als Zwischenprodukt zur Synthese von *S*-Lactyl-glutathion wurde von uns vor einiger Zeit *S*-Lactyl-thiophenol verwendet, das wir aus *S*-Alanyl-thiophenol durch Behandeln mit Salpetriger Säure herstellten²⁾. Bei dieser Gelegenheit erhob sich die Frage, ob Diazoacyl-thiophenole,



¹⁾ Dissertat. Frankfurt a. M. 1956.

²⁾ Th. Wieland u. H. Köppe, Liebigs Ann. Chem. 581, 1 [1953].