

Dinesh Kumar Kulshrestha und Maheshwari Prasad Khare

## Chemische Untersuchung der Samen von *Clitoria ternatea* L.

Aus dem Department of Chemistry, Lucknow University, Lucknow, Indien

(Eingegangen am 6. Februar 1967)

In der Butanol-löslichen Fraktion der Samen wurden dünn-schichtchromatographisch 13 Cersulfat-positive Verbindungen nachgewiesen. Von den sechs kristallisiert erhaltenen wurden vier als Adenosin, Kämpferol-3-rhamnoglucosid, *p*-Hydroxy-zimtsäure und Äthyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid identifiziert, die beiden restlichen als Polypeptid und Phenolglykosid.

Die bitteren Wurzeln der über die ganze tropische Region vom Himalaja bis Ceylon verbreiteten perennierenden Kletterpflanze *Clitoria ternatea* L. wirken abführend, reinigend und diuretisch. Die scharf und bitter schmeckenden Samen sollen ebenfalls reinigende und abführende Wirkung haben<sup>1)</sup>.

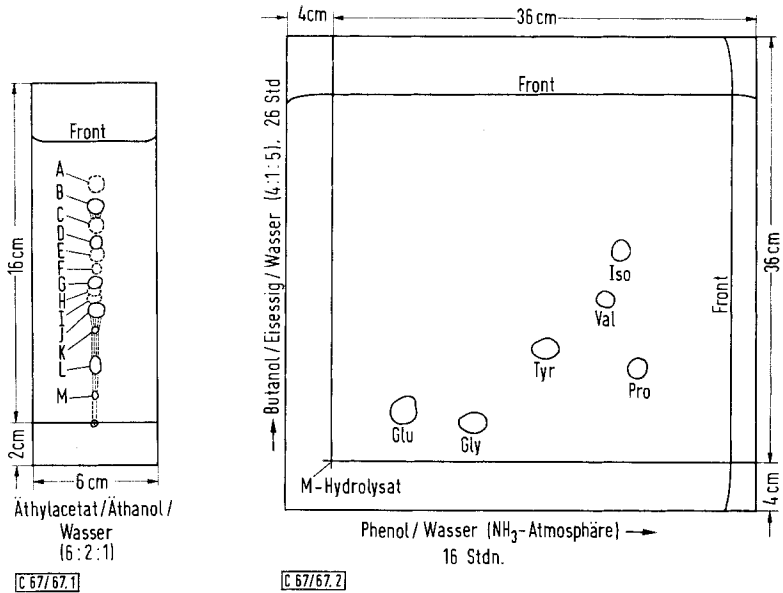
In den Samen fand man bisher ein gelbes fettes Öl, Tannine<sup>2)</sup>, einen bitter schmeckenden kristallinen Ester (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>), das amorphe Glucosid eines Steroidlactons<sup>3)</sup> und  $\gamma$ -Sitosterin<sup>4)</sup>, in den Blättern das Lacton Aparajitin (C<sub>26</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>)<sup>5)</sup> und in den Wurzeln Taraxorol<sup>6)</sup>. Die Blätter einer anderen Art, *Clitoria mariana* L., enthalten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sitosterin<sup>7)</sup>, ein dem Aparajitin verwandtes  $\delta$ -Lacton<sup>8)</sup>, einen D-Galaktose, L-Arabinose und Rhamnose enthaltenden Pflanzenschleim<sup>9)</sup>, die Samen und Blüten  $\gamma$ -Sitosterin und ein Farbstoff-Glykosid des Aglykons C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub><sup>9)</sup>.

### Extraktion der Samen

Wir entfetteten die getrockneten und gepulverten Samen mit Petroläther und extrahierten dann erschöpfend mit 85–95proz. Äthanol. Nach Eindampfen und Entfernen der Tannine mit Bleiacetat wurde nacheinander mit Chloroform, Chloroform/Butanol und schließlich Butanol extrahiert.

- 1) R. N. Chopra, S. L. Nayar und I. C. Chopra, Glossary of Indian Medicinal Plants, I Edition, S. 71, Council of Scientific & Industrial Research, New Delhi 1956.
- 2) W. Dymock, C. J. H. Warden und D. Hooper, Pharmacographia Indica, I Edition, Vol. I, S. 460, Education Society's Press, Bombay/Byculla 1890.
- 3) N. Singh und V. D. Gupta, Indian J. Pharm. **21**, 166 (1959).
- 4) A. Sinha, Current Sci. **29**, 180 (1960).
- 5) R. D. Tiwari und R. K. Gupta, J. Indian chem. Soc. **36**, 243 (1959).
- 6) S. K. Banerjee und R. N. Chakravarti, Bull. Calcutta School trop. Med. **11** (3), 106 (1963).
- 7) A. Sinha, Indian J. appl. Chem. **23**, 40 (1960).
- 8) A. Sinha, J. Proc. Instn. Chemists (India) **32**, 256 (1960).
- 9) A. Sinha, Proc. nat. Acad. Sci., India Sect. A **29**, 39 (1960).

Im Butanol-Extrakt ließen sich dünn-schichtchromatographisch durch Besprühen mit Cersulfat 13 Substanzen nachweisen, die mit A – M bezeichnet wurden (Abbild. 1).



Abbild. 1. Dünnschichtchromatogramm des Butanol-Extraktes (Äthanol-Extrakt der Samen mit Butanol weiter extrahiert) nach Besprühen mit Cersulfat

Abbild. 2. Zweidimensionales Papierchromatogramm (aufsteigend) vom Hydrolysat der Substanz M nach Besprühen mit Ninhydrin

Nach mehrfacher Rechromatographie an Silicagel mit Wasser-gesättigtem Äthylacetat erhielten wir die sechs Verbindungen A, B, G, I, J und M kristallisiert.

#### Substanz A

Aufgrund von Farbreaktionen und UV-Spektren, Misch-Schmp. und Vergleichs-chromatographie mit einem authent. Präparat sowie durch Überführung in das Acetyl-Derivat ist Substanz A mit *p*-Hydroxy-zimtsäure identisch.

#### Substanz B

Nach den Farbreaktionen war die Verbindung ein phenolisches Glykosid. Säurehydrolyse gab ein phenolisches Aglykon mit höherem  $R_F$ -Wert (Dünnschichtchromatographie) als das Ausgangsglykosid. Der Kohlenhydratanteil besteht nach chromatographischem Vergleich mit den authentischen Verbindungen aus Glucose und Fructose.

#### Verbindung G

Durch seine Farbreaktionen als Flavonoid-3-glykosid ausgewiesen, gab Substanz G bei der Hydrolyse Rhamnose, Glucose und als Aglykon Kämpferol (3.5.7.4'-Tetrahydroxy-flavon).

Die Verbindung zeigte in Äthanol Absorptionsmaxima bei 347 (I) und 266 m $\mu$  (II). Nach der Lage von Bande I war die 3-OH-Gruppe des Kämpferols nicht frei. Eine bathochrome Verschiebung von I um 43 m $\mu$  bei Zusatz von AlCl<sub>3</sub> bestätigte das und zeigte gleichzeitig eine freie 5-OH-Gruppe an. Weiter wurden eine freie 7-OH-Gruppe durch bathochrome Verschiebung von Maximum II um 7 m $\mu$  bei Zusatz von Natriumacetat sowie eine freie 4'-OH-Gruppe durch bathochrome Verschiebung um 53 m $\mu$  von Maximum I bei Zusatz von 0.002 *n* Natriumäthylat wahrscheinlich gemacht. Glucose und Rhamnose waren also offenbar als Biose-Einheit an die 3-OH-Gruppe des Flavons gebunden. Das Vorliegen von Kämpferol-3-rhamnoglucosid wurde endgültig anhand authent. Daten<sup>10)</sup> gesichert.

#### Substanz I

Farbreaktionen, saure Hydrolyse zu Ribose und Adenin, Analyse, Misch-Schmp., übereinstimmende IR-Spektren und Vergleichschromatographie bewiesen die Identität mit Adenosin.

#### Substanz J

Die durch Farbreaktionen als Glykosid gekennzeichnete Substanz gab bei der Säurehydrolyse D-Galaktose. Schmp. und spezif. Drehung von J und seinem Acetat stimmten mit den Daten von Äthyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid<sup>11)</sup> und dessen Tetra-O-acetat<sup>12)</sup> überein.

Der von *Ritthausen*<sup>13)</sup> aus den gelben Lupinensamen (*Leguminosae*) isolierte Galaktit wurde von *Fischer*<sup>14)</sup> als  $\alpha$ -Äthyl-galaktosid identifiziert. *Fischer* glaubte, daß die Verbindung erst unter dem Einfluß der bei der Extraktion angewendeten Schwefelsäure aus Äthanol und Galaktose oder aus einem Polysaccharid gebildet würde. Nachdem bei unseren Untersuchungen keine Säure zugegen war, muß Äthyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid als solches in *C. ternatea* vorkommen.

#### Substanz M

Die stickstoffhaltige Verbindung gab eine positive Ninhydrin-Reaktion und typische IR-Banden für ein sekundäres Amid bei 3300 (assoziiertes NH) und 1660, 1522 sowie 1230/cm (Amid I–III). Nach Hydrolyse mit 6 *n* HCl<sup>15)</sup> konnten wir durch zweidimensionale Papierchromatographie (Abbild. 2) die sechs Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin, Isoleucin, Prolin, Tyrosin und Valin identifizieren. Somit handelt es sich bei Substanz M um ein Peptid.

#### Biologische Aktivität

Die Verbindungen B und M wurden auf ihre Toxizität geprüft. Bis 2 mg/kg zeigten beide auf Mäuse keine toxische Wirkung.

<sup>10)</sup> V. V. S. Murti, P. V. Raman, T. R. Seshadri und R. S. Thakur, J. sci. ind. Res. [New Delhi] **21B**, 80 (1962); C. A. **56**, 15832 (1962).

<sup>11)</sup> E. Pacsu und N. Ticharich, Ber. dtsh. chem. Ges. **62**, 3008 (1929).

<sup>12)</sup> L. Asp und B. Lindberg, Acta chem. scand. **4**, 1386 (1950).

<sup>13)</sup> H. Ritthausen, Ber. dtsh. chem. Ges. **29**, 896 (1896).

<sup>14)</sup> E. Fischer, Ber. dtsh. chem. Ges. **47**, 456 (1914).

<sup>15)</sup> I. M. Hais und K. Macek, Handbuch der Papierchromatographie, 1. Aufl., Bd. I, S. 784, Gustav Fischer Verlag, Jena 1958.

Die Autoren danken Herrn Dr. *A. C. Roy*, Process Development Division, Central Drug Research Institute, Lucknow, für die Hilfe bei Extraktion des Pflanzenmaterials, Herrn Dr. *N. Anand*, Central Drug Research Institute, Lucknow, für die Bestimmung der biologischen Aktivität sowie Herrn Dr. *M. Barbier*, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Paris, für die Mikroanalysen. D. K. K. dankt dem Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, für ein Junior Research-Stipendium.

## Beschreibung der Versuche

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt. Die Proben für Analysen, spezif. Drehungen und Spektralanalysen trocknete man 3 Stdn. bei 110° i. Hochvak. über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. Zur Aufnahme der UV-Spektren diente ein Beckman-DU-Spektrophotometer, der IR-Spektren (in KBr) ein Gerät Infracord No. 337, und zur Bestimmung der spezif. Drehungen ein Schmidt-und-Haensch-Polarimeter.

**Dünnschichtchromatographie:** Die mit Kieselgel G (Fluka) beschichteten Platten wurden bei 120° aktiviert. Entwicklung mit Äthylacetat/Äthanol/Wasser (6 : 2 : 1) und mit reinem Äthylacetat. Die Flecke machte man durch Besprühen mit 1proz. Cersulfat-Lösung in 2 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Erhitzen auf 100–110°, Substanz B mit bis-diazotiertem Benzidin<sup>16)</sup> sichtbar.

**Papierchromatographie:** Papier Whatman No. 1, Sprühreagenzien: Anilinphthalat<sup>17)</sup> und Triphenyltetrazoliumchlorid<sup>18)</sup> zur Sichtbarmachung von Zuckern, 0.2proz. Ninhydrin-Lösung in Butanol/2n Essigsäure (95 : 5) für Aminosäuren.

## Extraktion der Samen

12 kg pulverisierte Samen wurden im Soxhlet-Apparat mit Petroläther entfettet (Eindampfrückstand des Auszugs 1.8 kg grünes Öl). Das entfettete Pulver extrahierte man zweimal mit je 50 l 85proz. Äthanol und 4mal mit je 40 l 95proz. Äthanol, dampfte die vereinigten Extrakte (250 l) unter vermindertem Druck bei 50° auf 20 l ein, verdünnte mit dem gleichen Volumen 95proz. Äthanol und gab zur Entfernung von Tanninen unter Rühren 530 ccm einer 30proz. wäßr. Lösung von Bleiacetat (159 g) zu. Nach Einstellen von pH 6 durch Hinzufügen von Ammoniak wurde durch eine 3 cm dicke Celit-Schicht filtriert und das klare Filtrat unter vermindertem Druck auf 5 l konzentriert.

Diese 5 l extrahierte man nun erneut nacheinander mit 5mal 700 ccm Chloroform, 5mal 400 ccm Chloroform/n-Butanol (7 : 3) sowie 3mal mit je 1 l n-Butanol und destillierte die Lösungsmittel unter vermindertem Druck ab (Tab. 1).

### *Aufarbeitung des Butanol-Extraktes*

Der Rückstand (80 g) mit den 13 Cersulfat-positiven Substanzen wurde in 2 Portionen zu 30 und 50 g an Silicagel weiter aufgetrennt.

Für *Chromatographie I* wurde eine Suspension von 600 g Silicagel in 700 ccm wassergesättigtem Äthylacetat homogen in eine 145 × 3.5 cm-Säule gefüllt. Vor dem Aufbringen der Substanzen ließ man noch weitere 1.5 l Solvens durchlaufen.

*Chromatographie II:* Wie vorstehend mit 700 g Silicagel und zusätzlich 3 l Solvens.

Bei *Chromatographie I* mischte man 30 g Substanzgemisch in 60 ccm Methanol gründlich mit 30 g gereinigtem trockenem Celit, entfernte das Methanol i. Vak. und gab den Rückstand

16) I. c.<sup>15)</sup>, S. 744.

17) *S. M. Partridge*, Nature [London] **164**, 443 (1949).

18) I. c.<sup>15)</sup>, S. 736.

Tab. 1. Ausbeuten in den verschiedenen Extrakten aus 12 kg Samen von *Clitoria ternatea*

Extrakt	Rückstand (g)	Ausb. %	Bemerkungen
Petroläther	1800	15	gelbgrünes Öl (nicht untersucht)
Chloroform	960	8	grüne harzige Masse, die sich dünnschicht- und papierchromatographisch nicht trennte (nicht untersucht)
Chloroform/ n-Butanol (7 : 3)	31	0.26	braune viskose Masse, die sich dünnschicht- und papierchromatographisch nicht trennte (nicht untersucht)
n-Butanol	80	0.66	braune viskose Masse, die auf dem Dünnschichtchromatogramm 13 Flecke gab (s. unten)

auf die Säule. 50 g Substanzgemisch und 50 g Celit setzte man in Chromatographie II ein. Beide Säulen wurden mit wassergesättigtem Äthylacetat, dem man 10% wasserfreies Äthylacetat zufügte, eluiert. Alle 12 Stdn. sammelte man 1-1-Fractionen. Ergebnisse s. Tab. 2 und 3.

Tab. 2. Chromatographie I: 30 g Rückstand des Butanol-Extrakts an 600 g SiO<sub>2</sub> mit wassergesättigtem Äthylacetat +10% Äthylacetat; 1-1-Fractionen

Frakt. Nr.	amorph (mg)	Eluat Flecke *)	Kristalle **)	weitere Untersuchung
1	774	A, (B)	50 mg A	Mutterlauge (710 mg) → Chromatographie III
2-3	2533	B	—	Chromatographie IV
4-5	3839	B, (C, D, E, F, G)	—	—
6-12	1315	(F), G, (H, I, J)	—	—
13-15	1584	G, (H, I), J, (M)	58 mg M	Mutterlauge (1080 mg) → Chromatographie VII
16-17	1301	G, (H, I), J, (M)	—	Chromatographie VII
18-27	9757	G, (H, I), J, (M)	662 mg J	Mutterlauge (4160 mg) → Chromatographie VII
28-33	627	J, K, (L)	—	—
34-36	191	(J, K, L)	—	—
Auswaschen mit Methanol	352	—	—	—

\*) Auf dem Dünnschichtchromatogramm.

\*\*) Siehe weiter unten bei den einzelnen Verbindungen.

**Chromatographie III:** Die Rückstände der Mutterlauge von Frakt. 1 aus Chromatographie I (710 mg) und Frakt. 2 aus Chromatographie II (208 mg) wurden vereinigt und an 30 g Silicagel rechromatographiert. Wir eluierten mit Chloroform und Chloroform/Äthylacetat mit steigenden Mengen des Esters und sammelten 30 Fractionen zu 20 ccm. Die Frakt. 7-8 (Chloroform/Äthylacetat 8 : 2) gaben 92 mg Rückstand, der aus Methanol 40 mg kristallisierte Substanz A mit Schmp. 212-214° gab. Andere Fractionen wurden nicht weiter untersucht.

Tab. 3. Chromatographie II: 50 g Rückstand des Butanol-Extraktes an 700 g SiO<sub>2</sub> mit wassergesättigtem Äthylacetat + 10% Äthylacetat; 1-*l*-Fraktionen

Frakt. Nr.	amorph (mg)	Flecke *)	Kristalle **)	weitere Untersuchung
1	50	A	—	—
2	348	A	105 mg A	Mutterlauge (208 mg) → Chromatographie III
3—6	3167	(A), B, (C)	—	Chromatographie IV
7—12	3904	B, (C, D)	—	—
13—18	7108	(D), E, F, G, M	—	—
19—21	1343	(F), G, (J, M)	10 mg G	Mutterlauge (1233 mg) → Chromatographie VII
22—25	2800	G, (J, M)	—	Chromatographie V
26—31	3845	G, (H, I, J, M)	—	Chromatographie VII
32—40	9370	J, (K)	1730 mg J	—
41—53	1592	(J, K, L)	—	—
Auswaschen mit Methanol	574	—	—	—

\*) Auf dem Dünnschichtchromatogramm.

\*\*) Siehe weiter unten bei den einzelnen Verbindungen.

*Chromatographie IV*: Die Fraktt. 2—3 von Chromatographie I (2.533 g) und 3—6 von Chromatographie II (3.167 g) wurden an 170 g Silicagel mit Chloroform und Chloroform/Äthylacetat (1:1) (32 Fraktt. zu 600 ccm) rechromatographiert. Fraktt. 3—5 (333 mg) gaben aus Methanol 59 mg kristallisierte Substanz A. Fraktt. 16—27 (3.45 g) setzte man in Chromatographie VI ein.

*Chromatographie V*: Man reinigte die Fraktt. 22—25 von Chromatographie II (2.8 g) weiter an 84 g Silicagel (250-ccm-Fraktt.). Das in Nr. 12—13 enthaltene reine G wurde aus Wasser kristallisiert. In allen anderen Fraktt. war G mit J vermischt, das nicht kristallisierte. Siehe Tab. 4.

Tab. 4. Chromatographie V: 2.8 g Substanz, enthaltend G (J, M) (Fraktt. 22—25 von Chromatographie II) an 84 g Silicagel

Frakt. Nr.	Lösungsmittel (1 Frakt. = 250 ccm)	amorph (mg)	Eluat Flecke *)	Kristalle	weitere Untersuchung
1—6	CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1:3)	46	—	—	—
7—11	CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1:3)	148	(G, H, I)	—	—
12—13	Äthylacetat	657	G	90 mg G	—
14—17	Äthylacetat	691	G, (J)	—	—
18—29	Äthylacetat	540	G, J	—	Chromatographie VII
30—44	Äthylacetat/Äthanol (9:1)	295	(G), J	—	—

\*) Auf dem Dünnschichtchromatogramm.

*Chromatographie VI:* Beim Besprühen mit Cersulfat-Lösung zeigten die Fraktt. 16–27 von Chromatographie IV (3.45 g) nur einen Fleck, mit bis-diazotiertem Benzidin<sup>16)</sup> jedoch wurden 3 Substanzen, B<sub>1</sub>, B und B<sub>2</sub> mit ähnlichen R<sub>F</sub>-Werten sichtbar. Das Gemisch wurde deshalb wie bei Chromatographie I an 300 g Silicagel aufgetrennt (alle 12 Stdn. 1 Frakt. zu 500 ccm). Nur Substanz B konnte aus den Fraktt. 41–49 und 50–94 kristallisiert werden. Aus Methanol Schmp. 218–220° (Tab. 5).

Tab. 5. Chromatographie VI: 3.45 g Substanz aus Fraktt. 16–27 von Chromatographie IV an 300 g Silicagel

Frakt. Nr.	Lösungsmittel (1 Frakt. = 500 ccm)	amorph (mg)	Flecke *)	Kristalle
1	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (3 : 1) +15% wasserfreies Solvens	18	—	—
2–5	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (3 : 1) +15% wasserfreies Solvens	16	—	—
6–8	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1 : 1) +15% wasserfreies Solvens	4	—	—
9–21	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1 : 1) +15% wasserfreies Solvens	20	B <sub>1</sub>	—
22–30	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1 : 3) +15% wasserfreies Solvens	21	(B <sub>1</sub> , B, B <sub>2</sub> )	—
31–32	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1 : 3) +15% wasserfreies Solvens	15	(B <sub>1</sub> ), B	—
33–40	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1 : 3) +15% wasserfreies Solvens	50	(B <sub>1</sub> ), B, (B <sub>2</sub> )	—
41–49	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1 : 3) +15% wasserfreies Solvens	320	(B <sub>1</sub> ), B, (B <sub>2</sub> )	20 mg B
50–94	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1 : 3) +15% wasserfreies Solvens	1750	B, (B <sub>2</sub> )	160 mg B
95–96	wassergesätt. CHCl <sub>3</sub> /Äthylacetat (1 : 3) +15% wasserfreies Solvens	78	B, B <sub>2</sub>	—
97–98	wassergesätt. Äthylacetat +15% wasserfreies Äthylacetat	28	(B), B <sub>2</sub>	—
99	Äthylacetat/Äthanol (1 : 1)	91	(B, B <sub>2</sub> )	—

\*) Auf dem Dünnschichtchromatogramm.

*Chromatographie VII:* An 150 g Silicagel chromatographierte man von Chromatographie I die Fraktt. 16–17, Mutterlaugen von 13–15 sowie 18–27, von Chromatographie II die Fraktt. 26–31 und die Mutterlaugen von 19–21 (zusammen 12.16 g) und nahm alle 12 Stdn. 1 l ab (Tab. 6). Aus einigen Fraktt. kristallisierten I, J und M, aus den anderen schied sich nichts ab.

Tab. 6. Chromatographie VII: 12.16 g Substanz an 150 g Silicagel

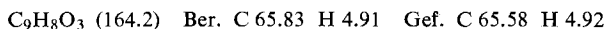
Frakt. Nr.	Lösungs- mittel	amorph (mg)	Eluat Flecke *)	Kristalle	weitere Untersuchung
1—5	wassergesätt. Äthylacetat	75	—	—	—
6—9	wassergesätt. Äthylacetat	99	(G, J)	—	—
10—17	wassergesätt. Äthylacetat	310	(G, H, I, J, K)	—	—
18—24	wassergesätt. Äthylacetat	615	(G), H, I, J, (K)	34 mg I	—
25—31	wassergesätt. Äthylacetat	668	(G, D, J, (K)	—	—
32—40	wassergesätt. Äthylacetat	992	(G), J, (K)	406 mg J	—
41—49	wassergesätt. Äthylacetat	2908	(G), J, (K, M)	—	Chromatographie VIII
50—58	wassergesätt. Äthylacetat +2% Äthanol	2434	(G), J, (K, M)	60 mg M	Mutterlauge (2362 mg) Chromatographie VIII
59—71	wassergesätt. Äthylacetat +2% Äthanol	3186	(G), J, (M)	—	Chromatographie VIII
72—75	wassergesätt. Äthylacetat +2% Äthanol	230	(G), J	—	—

\*) Auf dem Dünnschichtchromatogramm.

*Chromatographie VIII:* Zusammen 8.4 g Substanz aus Chromatographie VII (s. Tab. 6) trennte man weiter an 250 g Silicagel mit Äthylacetat, gefolgt von Äthylacetat mit 1—5% Äthanol. Die Fraktt. 8—14 (Äthylacetat/Äthanol 95 : 5) (2.38 g) lieferten aus Äthanol 200 mg kristallisierte Substanz J mit Schmp. 140°.

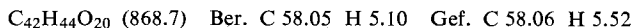
### Isolierte Verbindungen

*Substanz A = p-Hydroxy-zimtsäure:* Das nach Tab. 2 und 3 erhaltene amorphe A kristallisierte aus Methanol in hellbraunen Rhomben vom Schmp. 212—214° (50 bzw. 105 mg), UV (Äthanol):  $\lambda_{\max}$  290 m $\mu$  (log  $\epsilon$  4.24), keine Schmp.-Depression mit authent. Verbindung.



*Acetylierung von Substanz A:* 10 mg A in 0.2 ccm Pyridin und 0.2 ccm Acetanhydrid ergaben aus Äthanol 7 mg blaßbraune Nadeln, Schmp. 206—208°. UV (Äthanol):  $\lambda_{\max}$  270 m $\mu$  (log  $\epsilon$  4.40). Keine Schmp.-Depression mit *p*-Acetoxy-zimtsäure.

*Substanz B:* Die nach Chromatographie VI aus Methanol mit Schmp. 218—220° (unter Aufschäumen) erhaltenen Kristalle gaben aus Wasser farblose Nadelchen mit Schmp. 198 bis 200° und  $[\alpha]_D^{28}$ :  $-181.0^\circ$  ( $c = 1.0$  in Methanol). UV (Äthanol):  $\lambda_{\max}$  285 m $\mu$  (log  $\epsilon$  4.35), 315 (4.44).



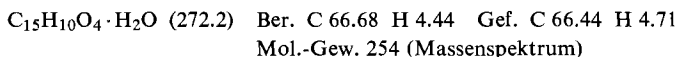


Die Verbindung gab einen purpurfarbenen Feigel-Test auf Kohlenhydrate<sup>19)</sup>, eine positive Reaktion auf Glykol mit NaJO<sub>4</sub>/Benzidin<sup>20)</sup> und ebenso mit Eisen(III)-chlorid<sup>21)</sup> auf phenolische Hydroxylgruppen.

*Hydrolyse*: 50 mg B in 1 ccm Äthanol wurden 4 Stdn. mit 1 ccm 4*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf dem Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Man zog die hellviolette Reaktionsmischung 4-mal mit je 2 ccm Äthylacetat aus, wusch die organ. Phase mit etwas Wasser und erhielt beim Verdampfen 28 mg amorphes violettes *Aglykon*.

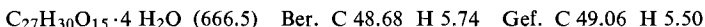
Die wäbr. Phase entsäuerte man durch Schütteln mit Ionenaustauscher IRA 400 (CO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>-Form) und erhielt nach Eindampfen 9 mg Sirup, der papierchromatographisch aus *Glucose* und *Fructose* bestand.

*Aglykon von B, Phenol C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>*: Die Lösung des vorstehend erhaltenen rohen Aglykons (28 mg) in 3 ccm Äthylacetat wurde mit heißem Wasser extrahiert. Verdampfen des Wassers ergab einen hellrosafarbenen Rückstand, der aus Äthylacetat in Körnchen vom Schmp. 250–251° (unter Aufschäumen) kristallisierte. UV (Äthanol): λ<sub>max</sub> 285 mμ (log ε 4.06), 325 (4.2).



Die Verbindung gab mit Eisen(III)-chlorid eine rosa Farbe.

*Substanz G = Kämpferol-3-rhamnoglucosid*: Die nach Tab. 3 erhaltene amorphe Substanz gab aus Wasser 10 mg hellgelbe seidige Nadeln mit Schmp. 201° (Lit.<sup>10)</sup>: 194–196°; [α]<sub>D</sub><sup>28</sup>: –61.25° (*c* = 1.0 in Methanol). UV (Äthanol): λ<sub>max</sub> 266 mμ (log ε 4.33), 347 (4.23); in 0.002*n* Natriumäthylat: λ<sub>max</sub> 275, 325, 400 mμ.

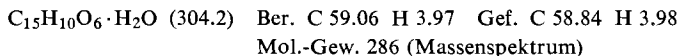


Die Verbindung gab eine rote Farbe mit Mg/HCl<sup>22)</sup>, eine rosa Farbe mit Zn/HCl<sup>23)</sup> und eine grünblaue Farbe mit äthanol. Eisen(III)-chlorid.

*Hydrolyse*: Man kochte 40 mg G in 1 ccm Äthanol mit 1 ccm 2*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 Stdn. auf dem Wasserbad unter Rückfluß, entfernte den Alkohol unter vermindertem Druck, extrahierte die wäbr. Lösung 4-mal mit je 1 ccm Äthylacetat, wusch jede Fraktion mit 1 ccm Wasser, verdampfte die vereinigten Auszüge zur Trockne und erhielt so 16 mg amorphes gelbes *Aglykon*.

Die wäbr. Lösung wurde mit IRA 400 (CO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>-Form) neutralisiert und dann zu 15 mg Sirup eingedampft. Er bestand aus *Glucose* und *Rhamnose* (Papierchromatographie).

*Aglykon von G*: Das rohe Aglykon (15 mg) kam aus Äthanol/Wasser in zitronengelben Kristallen, Schmp. 275° (Zers.). UV (Äthanol): λ<sub>max</sub> 266 mμ (log ε 4.22), 367 (4.29); in 0.002*n* Natriumäthylat: λ<sub>max</sub> 325 mμ.



Die Substanz wurde durch ihr charakteristisches UV-Spektrum und ihre Farbreaktionen als *Kämpferol* identifiziert: Mg/HCl (rot), äthanol. FeCl<sub>3</sub> (grünbraun). Farbe der Flecke im UV-Licht dunkel gelbgrün, in Gegenwart von NH<sub>3</sub> dunkelgelb und in Gegenwart von AlCl<sub>3</sub> leuchtend grün.

<sup>19)</sup> F. Feigel, Spot Tests, Organic Applications, IV Edition, Vol. II, S. 289, Elsevier Publishing Company, London 1954.

<sup>20)</sup> J. A. Cifonelli und F. Smith, Analytic. Chem. **26**, 1132 (1954).

<sup>21)</sup> E. Hardegger, Einführung in das Organisch-Chemische Praktikum, 2. Aufl., S. 60, Verlag der Vereinigung der Chemiestudierenden an der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich 1958.

<sup>22)</sup> J. Shinoda, J. pharmac. Soc. Japan **48**, 214 (1928).

<sup>23)</sup> M. Shimizu, J. pharmac. Soc. Japan **71**, 1329 (1951).

*Substanz I = Adenosin*: 615 mg eluiertes amorphes Substanzgemisch (Tab. 6) gaben aus Äthanol 34 mg farblose feine Nadelchen mit Schmp. 228–229°, nach Farbtesten<sup>20,24</sup>, IR-Spektrum und Misch-Schmp. identisch mit einer authent. Probe.

$C_{10}H_{13}N_5O_4$  (267.2) Ber. C 44.94 H 4.90 N 26.20 Gef. C 45.41 H 4.97 N 25.48

*Säurehydrolyse*: 2 mg Substanz *I* wurden in 0.4 ccm 0.5*n*  $H_2SO_4$  2 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Dann neutralisierte man durch Schütteln mit IRA 400 ( $CO_3^{2-}$ -Form) und identifizierte *Ribose* und *Adenin* durch Papierchromatographie.

*Substanz J = Äthyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid*: Den Rückstand aus den Fraktt. 18–27 (Tab. 2) löste man in Äthanol und stellte einige Tage in den Kühlschrank. Die abgeschiedenen Kristalle gaben aus Äthanol farblose Plättchen mit Schmp. 140°. Das amorphe Material in Tab. 6 gab aus Äthanol ebenfalls Kristalle mit Schmp. 140°.  $[\alpha]_D^{28}$ : +172° ( $c = 1.0$  in Methanol) (Lit.<sup>11</sup>): Schmp. 139–140°,  $[\alpha]_D^{28}$ : +186° in Wasser).

$C_8H_{16}O_6$  (208.2) Ber. C 46.15 H 7.74 Gef. C 45.82 H 7.73

*Säurehydrolyse*: Man erhitzte 100 mg *J* in 10 ccm 0.1*n*  $H_2SO_4$  1 Stde. auf 100° und destillierte dann auf dem Wasserbad. Im Destillat ließ sich mit der Jodoformprobe *Äthanol* nachweisen.

Der wäbr. Destillationsrückstand wurde mit überschüss.  $BaCO_3$  neutralisiert, durch eine Celit-Säule filtriert und das klare Filtrat zu einem Sirup eingedampft, der mit Methanol extrahiert wurde. Beim Konzentrieren des Auszugs schieden sich 72 mg farblose Kristalle ab, Schmp. 167–168°,  $[\alpha]_D^{28}$ : +79° ( $c = 1.0$  in Wasser); übereinstimmend in  $R_F$ -Wert und Misch-Schmp. mit authent. *D-Galaktose* (Lit.: Schmp. 163–168°,  $[\alpha]_D^{28}$ : +81°).

*Tetraacetyl-Derivat von J = Äthyl-2.3.4.6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid*: Aus 50 mg *J* in 1 ccm *Pyridin* und 1 ccm *Acetanhydrid*; aus Pentan 38 mg farblose Rhomben, Schmp. 87–88°,  $[\alpha]_D^{28}$ : +135° ( $c = 1.0$  in Methanol) (Lit.<sup>12</sup>): Schmp. 85–86°,  $[\alpha]_D^{28}$ : +136° in  $CHCl_3$ ).

*Substanz M*: Die amorphen Eluat-Rückstände (Tab. 2 und 6) gaben aus Äthanol farblose feine Nadeln mit Schmp. 210°,  $[\alpha]_D^{28}$ : –82° ( $c = 1.0$  in *Pyridin*).

$C_{51}H_{72}N_{10}O_{15} \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$  (1128.1) Ber. C 54.31 H 7.06 N 12.41 Gef. C 54.23 H 6.46 N 12.23

*Hydrolyse*: 5 mg *M* in 0.5 ccm 6 *n*  $HCl$  erhitzte man 24 Stdn. auf 110°, verdampfte dann i. Vak., versetzte mit ein paar Tropfen Wasser, trocknete im Vakuumexsiccator über  $KOH$  und nahm anschließend in 1 ccm 10proz. wäbr. Isopropylalkohol auf. Das Hydrolysat zeigte bei ein- und zweidimensionaler Papierchromatographie 6 Aminosäure-Flecke, die als *Glutaminsäure*, *Glycin*, *Prolin*, *Tyrosin*, *Valin* und *Isoleucin* identifiziert wurden.

<sup>24</sup>) I. c.<sup>15</sup>, S. 757.