

Rudolf Tschesche, Friedrich-Johannes Kämmerer und Günter Wulff

Über Glykoside mit lacton-bildendem Aglykon, II¹⁾

Über die Struktur der antibiotisch aktiven Substanzen der Tulpe (*Tulipa gesneriana* L.)

Aus dem Institut für Organische und Biochemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 30. November 1968)

Aus *Tulipa gesneriana* L. wurden zwei antibiotisch aktive Glucoside, 1-Tuliposid A (**14a**) und 1-Tuliposid B (**15a**), isoliert, die Acyl- β -D-glucopyranoside der γ -Hydroxy- α -methylbuttersäure bzw. (*S*)- β - γ -Dihydroxy- α -methylbuttersäure sind. Beide bisher unbekannt Säuren (**8** und **9**) wurden nach alkalischer Hydrolyse von **14a** bzw. **15a** erhalten. In saurer Lösung werden die Glucoside in D-Glucose und unter Lactonisierung der Säuren in die ebenfalls antibiotisch aktiven α -Methylen- γ -butyrolacton (**5**) und (*S*)- β -Hydroxy- α -methyl- γ -butyrolacton (**6**) gespalten. **14a** und **15a** gehen beim Aufbewahren unter Acylwanderung mehr oder weniger leicht in die antibiotisch inaktiven 6-Acylderivate, 6-Tuliposid A (**14b**) und 6-Tuliposid B (**15b**), über.

Aus einer Reihe von Pflanzen wurden niedermolekulare, flüchtige Lactone isoliert, von denen einige antibiotische Wirksamkeit aufweisen. Es ist meist unbekannt, in welcher Form die Lactone in der Pflanze selbst vorliegen, man vermutet, daß sie teilweise aus glykosidischen Vorstufen gebildet werden. In einigen Fällen sind solche Glykoside isoliert worden²⁻⁷⁾; auch liegen für vier dieser Inhaltsstoffe Strukturvorschläge vor, so für Ranunculin (**1**) aus verschiedenen Ranunculaceen²⁾, Glucosid **2** aus *Erythronium americanum*³⁾, Narthesid (**3**) aus *Narheticum ossifragum*⁴⁾ und Glucosid **4** aus *Mespillus germanica* L.⁵⁾

Wir haben aus der Tulpe zwei antibiotisch wirksame Glucoside isoliert, die leicht in α -Methylen- γ -butyrolacton bzw. β -Hydroxy- α -methyl- γ -butyrolacton übergehen. Als Vorstufen der Lactone liegen Glucoside in Form von 1-Acyl-glucosiden ungesät-

1) Als erste Mitteilung dieser Reihe gilt: R. Tschesche, F.-J. Kämmerer, G. Wulff und F. Schönbeck, Tetrahedron Letters [London] **1968**, 701.

2) ^{2a)} R. Hill und R. van Heyningen, Biochem. J. **49**, 332 (1951); ^{2b)} M. H. Benn und L. J. Yelland, Canad. J. Chem. **46**, 729 (1968).

3) C. J. Cavallito und T. H. Haskell, J. Amer. chem. Soc. **68**, 2332 (1946).

4) A. Stabursvik, Norges Tek. Vitenskapsakad., Ser. 2, **6**, 89 (1959), C. A. **55**, 14599 (1961).

5) D. L. Stanimirović und S. G. Stanimirović, Bull. Soc. chim. Belgrade **28**, 173 (1963), C. A. **62**, 8117 (1965).

6) U. W. Brongersma-Oosterhoff, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **86**, 705 (1967).

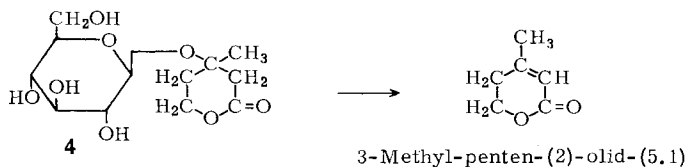
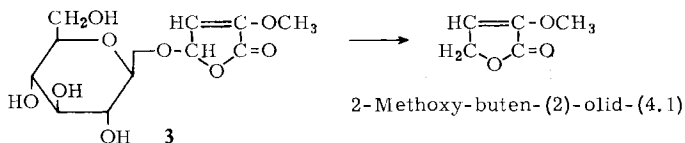
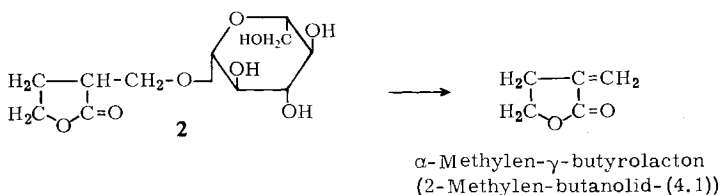
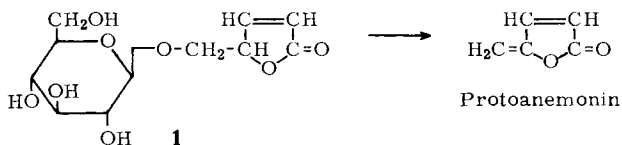
7) E. Letzig, Nahrung **8**, 49 (1964), C. A. **60**, 13498 (1964).

tigter γ -Hydroxysäuren vor¹⁾. Es handelt sich hierbei um einen neuartigen Typ antibiotisch aktiver Pflanzeninhaltsstoffe, von dem zu vermuten ist, daß er in der Natur weiter verbreitet vorkommt.

Die antibiotische Wirksamkeit der Tulpe wurde 1943 von *Osborn*⁸⁾ erstmalig beschrieben. Später stellte *Schönbeck*⁹⁾ im Rahmen phytopathologischer Untersuchungen fest, daß Tulpenstempel von polyphagen Pilzen, die bei anderen Pflanzen Infektionen hervorriefen, nicht befallen wurden. Die zunächst als Tulpenhemmstoffe bezeichneten Wirkstoffe sind in der Narbe am stärksten vertreten; ihre Konzentration nimmt über Fruchtknoten, Blätter, Stengel und Zwiebel zu den Wurzeln stark ab⁹⁾.

Während unserer Arbeiten¹⁾ zur Klärung der Natur der Wirkstoffe erschienen zwei Mitteilungen niederländischer Arbeitsgruppen über die Isolierung von α -Methylen- γ -butyrolacton als fungicide Komponente der Zwiebeln der Tulpe¹⁰⁾ und ferner über ein Glucosid unbekannter Struktur, das bei der Hydrolyse α -Methylen- γ -butyrolacton und D-Glucose liefert⁶⁾. Auf dieses soll die Allergie hervorrufende Wirkung der Tulpenzwiebeln zurückgehen⁶⁾.

Bisherige Strukturvorschläge für lactonbildende Glykoside sowie die Struktur der daraus leicht entstehenden Lactone:



8) E. M. Osborn, Brit. J. exp. Pathol. **24**, 227 (1943).

9) F. Schönbeck, Phytopathol. Z. **59**, 205 (1967).

10) B. H. H. Bergman, J. C. M. Beijersbergen, J. C. Overeem und A. K. Sijpesteijn, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **86**, 709 (1967).

Zur Isolierung der Inhaltsstoffe der Stempel sowie der Blätter und Stengel extrahierte man die Pflanzenteile mit 80proz. Methanol. Der größte Teil der antibiotischen Aktivität verblieb beim Ausschütteln des eingeeigneten Extraktes mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln in der wäßrigen Phase. Zur Bestimmung der in dieser Lösung befindlichen Substanzen wurden sie in dem für Zuckertrennungen viel benutzten papierchromatographischen System Essigester/Pyridin/Wasser (3.6:1:1.15)¹¹⁾ untersucht. Dabei zeigte sich, daß die wäßrige Phase des Extraktes aus Stengeln und Blättern fünf mit Aniliphthalat anfärbbare Stoffe mit den R_G -Werten (auf D-Glucose = 1.00 bezogen) 1.00, 1.25, 1.72, 2.09 und 3.12 und der Stempalextrakt vier mit den R_G -Werten 1.00, 1.25, 2.09 und 3.12 enthielt. Nach Aufbringung der Chromatogramme auf Bakterienagar mit *Bacillus subtilis*-Einsaat traten in beiden Extrakten jeweils drei Hemmzonen mit den R_G -Werten 3.12, 2.09 und 1.00 in unterschiedlicher Stärke auf, wobei sich im Stempalextrakt die Haupthemmzone bei $R_G = 2.09$ und beim Stengel- und Blätterextrakt bei $R_G = 3.12$ befand. Die aktiven Verbindungen mit den R_G -Werten 3.12, 2.09 und 1.00 haben wir zunächst als Tuliposid A, B und C bezeichnet. Die Substanzen mit den R_G -Werten 1.00, 1.25 und 1.72 ließen sich papierchromatographisch als Glucose, Fructose und Xylose identifizieren. Tuliposid C, das in beiden Extrakten nur in viel kleinerer Menge als Begleiter der Glucose auftrat, wurde nicht näher untersucht. Eine Auftrennung der Extrakte und damit eine Isolierung der Tuliposide A und B (zur Einheitlichkeit s. S. 2064, unten) gelang durch Säulenchromatographie an Cellulose mit dem für die Papierchromatographie benutzten Lösungsmittelsystem. Man erhielt, bezogen auf Trockensubstanz, aus den Blättern und Stengeln 5.6% Tuliposid A (**14**) und 2.0% Tuliposid B (**15**), aus den Stempeln 19.5% Tuliposid A und 12.8% Tuliposid B. Die Substanzen liegen also in ungewöhnlich hoher Konzentration in den Pflanzenteilen vor.

Beide Verbindungen konnten nicht kristallin erhalten werden; sie zeigten eine Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: +64° (Wasser) (A) und $[\alpha]_D^{20}$: +56° (Wasser) (B). Im Reihenverdünnungstest gegenüber *Bacillus subtilis* zeigte A vollständige Wachstumshemmung bei 100 γ /ccm und B bei 40 γ /ccm. Die Aktivität nahm selbst bei -20° im Laufe der Zeit stark ab, ohne daß aber die R_G -Werte oder die Spektren der Substanzen sich wesentlich änderten. Das beim Aufbewahren entstehende antibiotisch inaktive Tuliposid A konnte kristallisiert werden, Schmp. 128°, $[\alpha]_D^{20}$: +45.5° (Methanol). Das entsprechende inaktive Produkt von Tuliposid B kristallisierte nicht. Im UV zeigten Tuliposid A und B eine Schulter bei 207 m μ (A) bzw. 212 m μ (B) mit $\epsilon = 17000$. Das IR-Spektrum wies auf eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe hin (1708, 1628/cm).

Beide Substanzen reagierten nicht sauer. Bei der Acetylierung lieferte A laut Protonenresonanz ein Pentaacetat.

Bei der sauren und alkalischen Hydrolyse verhielten sich aktives und inaktives Tuliposid A bzw. B ebenfalls gleich. A lieferte bei der sauren Hydrolyse als Spalt-

¹¹⁾ P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirota, G. Ruffini und A. Sartori, J. Chromatogr. [Amsterdam] **3**, 343 (1960).

stücke α -Methylen- γ -butyrolacton (**5**) und D-Glucose. Die Struktur des Butyrolactons ergibt sich aus dem IR- (1760, 1662/cm), dem NMR- (Tab. 1) und dem Massenspektrum mit Hochauflösung; letzteres liefert die Zusammensetzung $C_5H_6O_2$.

Das NMR-Spektrum zeigt die Signale der Methylen-Protonen bei $\tau = 3.74$ und 4.28 jeweils als Triplett (Long range-Kopplung mit den β -Protonen von 3 Hz). Die beiden β -H werden durch die γ -Protonen zu einem Triplett mit $J = 7$ Hz aufgespalten. Jedes Triplett erscheint infolge Aufspaltung durch die Methylen-Protonen nochmals als Triplett mit $J = 3$ Hz. Die beiden γ -H bilden ein einfaches Triplett mit $J = 7$ Hz.

Die saure Spaltung von Tuliposid B lieferte D-Glucose und das bis jetzt unbekanntes β -Hydroxy- α -methylene- γ -butyrolacton (**6**), das durch physikalisch-chemische Methoden in der Struktur geklärt wurde. Das Protonenresonanzspektrum von **6** zeigte gegenüber dem α -Methylen-butyrolacton **5** ein ähnliches, aber charakteristisch verändertes Bild.

Die Resonanzen der Methylenprotonen erscheinen in der gleichen Lage, aber infolge nur eines H am β -C als Dublett. Die γ -Protonen zeigen in der Aufspaltung ebenfalls eine Veränderung. Sie sind durch die Substitution am Nachbaratom β -C ungleichwertig geworden und erscheinen als AB-Spektrum ($J_{AB} = -9.5$ Hz, $\Delta\delta_{AB} = 19$ Hz), das durch das β -H zusätzlich jeweils zu Dubletts mit der Kopplung $J = 6.5$ Hz (A-Teil) und 4 Hz (B-Teil) aufgespalten wird. Vom β -C tritt nur ein 1-Protonensignal auf, das durch die Substitution mit OH gegenüber **5** stark zu niedrigerem Feld verschoben ist und infolge vielfältiger Kopplung ($J = 4$ und 6.5 Hz) als komplexes Multipllett erscheint. Zusätzlich tritt ein OH-Signal bei $\tau = 7.5$ auf, das bei D_2O -Zusatz verschwindet. Diese Daten sind nur mit der Struktur **6** zu vereinbaren.

Bei der Massenspektroskopie mit Elektronenstoß erhält man von **6** als Peak der höchsten Masse $M^+ - H_2O$, während die Feldionenmassenspektroskopie als Basispeak m/e 115 ($M^+ + 1$) liefert¹²⁾.

6 besitzt ein Chiralitätszentrum am β -C und ist optisch aktiv; $[\alpha]_D^{20}$: -82° (Chloroform). Man findet einen schwach negativen Cotton-Effekt im Circular dichroismus von 212 $m\mu$ ($\Delta\epsilon -0.0472$), 207 $m\mu$ ($\Delta\epsilon -0.0591$). Zur Ermittlung der Absolutkonfiguration am β -C wurde **6** nach *Snatzke* und *Himmelreich*¹³⁾ mit Diazomethan in ein Pyrazolinderivat übergeführt. Dabei entstanden zwei Stereoisomere **7a** und **b** im Verhältnis etwa 3:1, die durch Chromatographie an SiO_2 rein und kristallin erhalten wurden. Das unpolare Hauptprodukt **7a** zeigte im IR-Spektrum der verdünnten Lösung keine intramolekulare Wasserstoffbrücke und im CD-Spektrum einen starken negativen Cotton-Effekt 323 $m\mu$ ($\Delta\epsilon -7.66$), 232 $m\mu$ ($\Delta\epsilon -5.12$), so daß nach den Untersuchungen von *Suchý*, *Snatzke* et al.¹⁴⁾ dem Pyrazolinderivat die Struktur **7a** und dem Lacton die Struktur eines (*S*)- β -Hydroxy- α -methylene- γ -butyrolactons (**6**) zukommen muß¹⁵⁾. Aus dem negativen Cotton-Effekt von **7a** läßt sich die Absolut-

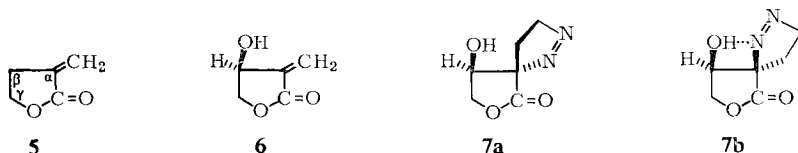
12) Mit Hilfe der Massenspektroskopie mit Feldionisation konnten bei einer Reihe von Verbindungen die Molekül-Ionen als Basispeak erhalten werden, die bei der Elektronenstoßmassenspektroskopie nicht auftraten. Wir danken Herrn Professor Dr. H. D. Beckey und Herrn Dipl.-Phys. H. Krone, Physikalisch-Chemisches Institut Bonn, für das freundliche Entgegenkommen bei der Durchführung dieser Messungen.

13) G. Snatzke und J. Himmelreich, *Tetrahedron* [London] **23**, 4337 (1967).

14) M. Suchý, L. Dolejš, V. Herout, F. Šorm, G. Snatzke und J. Himmelreich, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **39**, 229 (1969).

15) Herrn Dozent Dr. G. Snatzke aus unserem Institut danken wir für den Vorschlag zur Absolutbestimmung und die Auswertung dieser Spektren.

konfiguration des Pyrazolinringes am α -C ermitteln, und durch die fehlende Wasserstoffbrückenbindung ist auch die Stellung der OH-Gruppe am β -C geklärt. Das Nebenprodukt **7b** besitzt dagegen eine intramolekulare Wasserstoffbrücke und einen zu **7a** entgegengesetzten, positiven Cotton-Effekt, hat also die Struktur **7b**. Die Anwendbarkeit der Pyrazolinregel auf die hergestellten Pyrazolinderivate ist ein weiteres Beispiel für diese elegante Methode zur Bestimmung der Absolutkonfiguration.



Bei der enzymatischen Spaltung von Tuliposid A mit Schneckenenzym wie auch bei der alkalischen Spaltung mit $n/2$ Ba(OH)₂ bzw. $n/2$ KOH bei Raumtemperatur erhält man D-Glucose und γ -Hydroxy- α -methylen-buttersäure (**8**) vom Schmp. 65°. Die Struktur dieser bisher unbekanntten Säure wurde wiederum durch IR- (1695, 1628/cm), Massen- und NMR-Spektrum ermittelt. Die Protonenresonanz zeigte bei einem infolge der freien Drehbarkeit einfacheren Kopplungsschema sehr große Ähnlichkeit mit **5** (Tab. 1). Auch hier ergab das Massenspektrum mit Feldionisation $M^+ + 1 = 117$ als Basispeak. In entsprechender Weise erhielt man aus Tuliposid B durch alkalische Spaltung D-Glucose und β , γ -Dihydroxy- α -methylen-buttersäure (**9**) vom Schmp. 114–115°, $[\alpha]_D^{20}$: +14.7° (Methanol), die nach dem Ergebnis der Bestimmung der Absolutkonfiguration am entsprechenden Lacton S-Konfiguration haben muß. Die Massenspektroskopie mit Feldionenquelle zeigte als Basispeak $M^+ + 1$ (m/e 133). Das NMR-Spektrum (Tab. 1) steht mit der Struktur **9** in guter Übereinstimmung. Bemerkenswert ist die Stabilität der beiden freien γ -Hydroxycarbonsäuren **8** und **9**, die keine allzu starke Lactonisierungstendenz zeigen. Dieses Verhalten dürfte auf die α -Methylen-Gruppierung zurückzuführen sein.



Tab. 1. Protonenresonanzen der isolierten Verbindungen (τ -Werte, J in Hz)

| | $=\text{CH}_2$ | β -H | 2 γ -H |
|-----------------------|---------------------------------|--|---|
| Lacton 5 | 3.74 (t; 3); 4.28 (t; 3) | 2H bei 6.98; J_1 (t; 7); J_2 (t; 3) | 5.59 (t; 7) |
| Lacton 6 | 3.50 (d; 2); 3.92 (d; 2) | 1H bei 5.02 (m) | $\tau_A = 5.48$; $J_{AB} = -9.5$; $J_{AX} = 6.5$; $\tau_B = 5.78$; $J_{BX} = 4$ |
| Säure 8 *) | 3.67 (s); 4.18 (d; 1.3) | 2H bei 7.38 (t; 6.5) | 6.20 (t; 6.5) |
| Säure 9 *) | 3.50 (d; 0.5); 3.91 (d; 1.5) | 1H \sim 5.27 (m) | $\tau_A = 6.13$; $J_{AB} = -11.5$; $J_{AX} = 4$; $\tau_B = 6.31$; $J_{BX} = 6.5$ |
| Glucosid 14 *) | 3.57 (s); 4.08 (d; 1) | 2H 7.30 (t; 6.5) | 6.14 (t; 6.5) |
| Acetat 17 | 3.68 (s); 4.29 (d; 1.3) | 2H 7.34 (t; 6.5) | 5.78 (t; 6.5) |
| Glucosid 15 *) | 3.43 (d; 0.5) 3.85 (d; 1.3) | 1H \sim 5.29 (m) | $\tau_A = 6.11$; $J_{AB} = -11.5$; $J_{AX} = 4$; $\tau_B = 6.29$; $J_{BX} = 6.5$ |

*) Gemessen in D₂O mit TMS als externem Standard $\tau = 10$. In den anderen Fällen in CDCl₃ mit TMS als internem Standard $\tau = 10$.

Um den Säureanteil im Tuliposid A weiter zu sichern, wurde es mit H_2 /Platin in Methanol hydriert. Als Spaltstücke des Hydrierungsproduktes mit wäßriger Salzsäure erhielt man D-Glucose und ein Gemisch, das nach gaschromatographischer Analyse noch aus mindestens zwei Verbindungen bestand. Sie ließen sich durch präparative Gaschromatographie trennen und wurden anschließend im Massenspektrometer (mit Hochauflösung) untersucht. Die in größerer Menge ($\sim 90\%$) vorliegende Substanz zeigte den Basispeak bei 100.0525, entsprechend einer Zusammensetzung $C_5H_8O_2$, die zweite Substanz bei 98.0368, entsprechend $C_5H_6O_2$.

Aufgrund der Massen-, NMR- und IR-Spektren handelt es sich bei diesen Substanzen um das α -Methyl- γ -butyrolacton (**10**) und um ein Gemisch aus α -Methylen- γ -butyrolacton (**5**) und 2-Methyl-buten-(2)-olid-(4.1) (**11**). Die letztgenannten ließen sich gaschromatographisch an einer Kapillarsäule trennen.



Als Spaltprodukte des hydrierten Tuliposids A mit wäßrigen Alkalien ließen sich drei Säuren nachweisen: γ -Hydroxy- α -methyl-buttersäure (**12**), γ -Hydroxy-tiglin-säure (**13**) und γ -Hydroxy- α -methylen-buttersäure (**8**), **12** wurde bei der Aufarbeitung z. T. als Lacton **10** erhalten. Es wurde ebenso wie **8** durch NMR-Spektroskopie identifiziert. γ -Hydroxy-tiglin-säure wurde in kristalliner Form isoliert und mit einer nach Korte et al.¹⁶⁾ dargestellten Vergleichssubstanz identifiziert.



Die Hydrierung des Tuliposids A ist also offenbar nicht vollständig verlaufen. Bemerkenswerterweise treten als Spaltprodukte des nichthydrierten Anteils zwei Lactone (α -Methylen- γ -butyrolacton und α -Methyl-buten-(2)-olid-(4.1)) und zwei Säuren (γ -Hydroxy- α -methylen-buttersäure und γ -Hydroxy-tiglin-säure) auf, während das ursprüngliche Tuliposid A jeweils nur eine Verbindung lieferte. Wie sich bei der Hydrierung von α -Methylen- γ -butyrolacton (**5**) und γ -Hydroxy- α -methylen-buttersäure (**8**) zeigte, verschiebt sich die Doppelbindung durch den Katalysator teilweise, wobei aus **5** die Verbindung **11** und aus **8** die Verbindung **13** entsteht. Diese Stoffe sind somit Kunstprodukte bei der Hydrierung.

Es erhebt sich die Frage, in welcher Form die Säuren in den Glucosiden gebunden sind. Die NMR-Spektren der freien Säuren und der zugehörigen Glucoside stimmen weitgehend überein, während die zugehörigen Lactone eine andersartige Aufspaltung zeigen. Tuliposid A und B geben Doppelbindungsprotonensignale entsprechend zwei H bei $\tau = 3.57$ und 4.08 (**14**) bzw. 3.43 und 3.85 (**15**), die gleiche Aufspaltung und Kopplungskonstanten zeigen wie in den zugehörigen Säuren. Ferner weist das Kernresonanzspektrum von **14** als nicht von Zuckern herrührende Protonensignale ein Triplett bei $\tau = 6.14$ entsprechend 2H und ein verbreitertes Triplett bei $\tau = 7.30$, entsprechend 2H auf; das Spektrum von **15** enthält in Analogie zu **9** ein Multiplett bei $\tau = 5.29$ entsprechend 1 H und den AB-Teil eines ABX-Spektrums bei $\tau_A = 6.11$ und $\tau_B = 6.29$ entsprechend 2 H. Hinzu kommen in beiden Fällen noch 7 Zuckerprotonen der D-Glucose, die zwischen $\tau = 5.0$ und 7.0 liegen. Für die Struktur der

¹⁶⁾ F. Korte und O. Behner, Chem. Ber. **89**, 2675 (1956).

Glucoside aufschlußreich ist ferner, daß sie keine saure Reaktion zeigen. Aus der Zahl der Acetylgruppen im acetylierten Tuliposid A (**17**) und der typischen Verschiebung von ~ 0.6 τ -Einheiten der γ -CH₂-OR-Protonen durch die Acetylierung (siehe Tab. 1) geht hervor, daß die Hydroxylgruppe im Säureteil in den Glucosiden frei vorliegt; der Säurerest muß daher esterartig mit der Glucose verbunden sein, worauf auch die leichte Spaltbarkeit im alkalischen Medium hinweist. Offen bleibt, in welcher Position die Säure an der Glucose angreift.

Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst mit dem inaktiv gewordenen Tuliposid A gearbeitet. Es wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit 3.4-Dihydro-pyran und einer katalytischen Menge Säure in die OH-freie Verbindung **18** übergeführt. Sie wurde anschließend alkalisch verseift und darauf in DMSO mit NaH/CH₃J¹⁷⁾ methyliert. Nach saurer Abspaltung der Schutzgruppen erhielt man eine Monomethylglucose, welche die Methylgruppe an der Stelle tragen sollte, an der vorher der Säurerest gesessen hatte. Sie erwies sich als 6-O-Methyl-D-glucose, die in allen Eigenschaften mit der nach *Freudenberg* und *Hüll*¹⁸⁾ hergestellten Vergleichssubstanz identisch war.

Die beschriebene Reaktionsfolge, die zur Festlegung der Verknüpfungsstelle der γ -Hydroxy- α -methylen-buttersäure im inaktiven Tuliposid A angewendet wurde, ließ sich leider nicht auf das aktive Tuliposid A übertragen, da es zu leicht Umwandlungen erleidet. Dagegen ist das aktive Tuliposid B stabiler; die antibiotische Aktivität nimmt daher bei der Lagerung wesentlich langsamer ab. Es gelang, mit frisch isoliertem, aktivem Tuliposid B die beim inaktiven Tuliposid A beschriebene Reaktionsfolge der Umsetzung mit 3.4-Dihydro-pyran, anschließende alkalische Spaltung, die Methylierung und die abschließende Entfernung der Schutzgruppen im schwach sauren Medium durchzuführen. Das in guter Ausbeute erhaltene Monomethylglucose-Derivat wurde in kristalliner Form isoliert und erwies sich nach Vergleich mit authentischer Substanz als Methyl- β -D-glucopyranosid.

Damit ist gesichert, daß der Säurerest im aktiven Tuliposid B über das glykosidische OH am C-1 gebunden ist, daß es sich also um ein Acylglykosid handelt. Für das aktive Tuliposid A ist aufgrund der außerordentlichen Ähnlichkeit mit B ein analoger Aufbau anzunehmen. Dafür spricht, daß im aktiven und inaktiven Tuliposid A und entsprechend in B die Spaltstücke der Hydrolyse gleich sind und keine Unterschiede im NMR-Spektrum des Säureanteils auftreten. Der Hauptunterschied der aktiven und inaktiven Verbindungen liegt in der viel leichteren Spaltbarkeit der aktiven Substanz, die schon an Kieselgel und Aktivkohle eintritt, während die inaktive Verbindung keine Spaltung erleidet. Auch beim Stehenlassen in Wasser von pH 6 tritt bei den aktiven Verbindungen **14a** und **15a** allmählich Hydrolyse zu Glucose und den zugehörigen Lactonen auf, eine Reaktion, die man zur einfachen Gewinnung der Lactone benutzen kann. Man kann daher annehmen, daß aktives Tuliposid A ebenfalls ein 1-Acylderivat der Glucose ist. Von solchen 1-Acylverbindungen ist bekannt, daß sie leichter als die entsprechenden Ester gespalten werden und daß sie

¹⁷⁾ *S. Hakomori*, J. Biochemistry [Tokyo] **55**, 205 (1964); *D. M. W. Anderson* und *G. M. Cree*, Carbohydrate Res. **2**, 162 (1966).

¹⁸⁾ *K. Freudenberg* und *G. Hüll*, Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 237 (1941).

schnell Acylwanderungen eingehen, die im Falle der 1-Acylglucosen über ein 2-Acyl- bis zum 6-Acylderivat als stabiler Endstufe führt¹⁹⁾.

Ein weiterer Hinweis für eine derartige Acylwanderung stellt die beobachtete Photoaktivierung des Tuliposids A dar. Bestimmte Proben des im Winter aus Treibhaustulpen gewonnenen Tuliposids A, die antibiotisch ziemlich inaktiv waren, ließen sich durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (254 m μ) aktivieren (350 γ /ccm \rightarrow 120 γ /ccm für vollständige *B. subtilis*-Hemmung). Bei älteren Proben war dies nicht mehr möglich. Es ist denkbar, daß neben dem antibiotisch aktiven 1-Acyl- und dem inaktiven 6-Acylderivat auch noch die Zwischenstufe eines 2-Acylderivates vorliegen kann, die dann durch UV-Licht in das 1-Acylderivat übergeht, während dies für ein 6-Acylderivat nicht mehr möglich ist. Ob diese Hypothese zutreffend ist, muß in weiteren Versuchen geklärt werden.

Zur Unterscheidung sollen das aktive Tuliposid A (**14a**) und B (**15a**) als 1-Tuliposid A bzw. 1-Tuliposid B und das inaktive A (**14b**) und B (**15b**) als 6-Tuliposid A bzw. 6-Tuliposid B bezeichnet werden. Weitere Zwischenstufen können dann entsprechend der Stellung des Acyls benannt werden.

Über die Art der Verknüpfung der Säurereste in den 1-Tuliposiden (α - oder β -glykosidisch) sollte das NMR-Signal des Wasserstoffs am anomeren C-Atom des Zuckers Aufschluß geben. Dieses Signal liegt z. B. bei der Penta-*O*-acetyl- β -D-glucose als Dublett bei $\tau = 4.28$ mit $J = 7.0$ Hz, während es bei der Penta-*O*-acetyl- α -D-glucose bei niedrigerem Feld ($\tau = 3.60$) als Dublett mit $J = 3.0$ Hz erscheint. Reine α -D-Glucose liefert in D₂O ein Dublett bei $\tau = 4.80$, $J = 3$ Hz. Das kristallisierte 6-Tuliposid A zeigt ein Dublett bei $\tau = 4.80$, $J = 3$ Hz, enthält also am C-1 eine unsubstituierte OH-Gruppe in α -Stellung (vgl. Tab. 2).

Tab. 2. Lage und Aufspaltung der Resonanz des Wasserstoffs am anomeren C-Atom im NMR-Spektrum^{*)}

| Substanz | τ | J |
|---|----------------|--------------|
| α -D-Glucose | 4.80 | 3.0 |
| β -D-Glucose | 5.40 | 7.0 |
| Penta- <i>O</i> -acetyl- α -D-glucose ^{**)} | 3.60 | 3.0 |
| Penta- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucose ^{**)} | 4.28 | 7.0 |
| 6-Tuliposid A | 4.80 | 3.0 |
| 6-Tuliposid B | 4.80 | 3.0 |
| 1-Tuliposid A | 4.75 (4.80) | 7.0 (3.0) |
| 1-Tuliposid B | 4.75 (4.80) | 7.5 (3.0) |

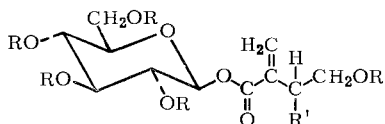
^{*)} NMR-Spektren in D₂O bei 60 MHz mit Acetonitril als internem Standard $\tau = 8$.

^{**)} Spektren in CDCl₃ mit Tetramethylsilan als internem Standard $\tau = 10$.

Das untersuchte aktive Tuliposid A stellt offenbar eine Mischung dar, in der neben dem 1-Acylderivat bereits Produkte der Acylwanderung mit einer freien α -OH-

¹⁹⁾ H. G. Fletcher in R. L. Whistler und M. L. Wolfrom, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Bd. II, S. 231, Academic Press, New York 1963; J. Staněk, M. Černý, J. Kocourek und J. Pacák, *The Monosaccharides*, S. 184 f., Academic Press, New York 1963.

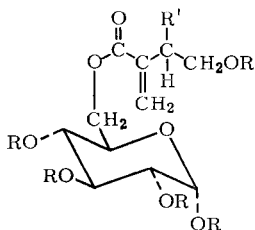
Gruppe am C-1 ($\tau = 4.80$, $J = 3.0$) vorliegen. Die möglicherweise vorhandene entsprechende β -OH-Verbindung ist wegen Überlagerung mit anderen Signalen nicht erkennbar. Ein Dublett bei $\tau = 4.75$, $J = 7.0$, zeigt durch chemische Verschiebung und Kopplungskonstante an, daß die Säure im 1-Tuliposid A in β -Stellung verknüpft ist. Gleiches gilt für das 1-Tuliposid B, das aber weniger durch Produkte einer Acylwanderung verunreinigt ist. Damit ist für das 1-Tuliposid A die Struktur eines $[\gamma$ -Hydroxy- α -methylen-buteryl]- β -D-glucopyranosids (**14a**) und für das 1-Tuliposid B die eines $[(S)$ - β - γ -Dihydroxy- α -methylen-buteryl]- β -D-glucopyranosids (**15a**) bewiesen.



14a: R = R' = H, 1-Tuliposid A

15a: R = H, R' = OH, 1-Tuliposid B

16: R = Tetrahydropyranyl-(2),
R' = OH



14b: R = R' = H, 6-Tuliposid A

15b: R = H, R' = OH, 6-Tuliposid B

17: R = Ac, R' = H

18: R = Tetrahydropyranyl-(2),
R' = H

Das von *Cavallito* und *Haskell*³⁾ aus *Erythronium americanum* isolierte Glucosid des α -Methylen- γ -butyrolactons soll die Struktur **2** besitzen. Bei der Spaltung durch Enzyme und Säuren entsteht daraus **5**. Nach den von *Cavallito* und *Haskell* mitgeteilten Eigenschaften dürfte dieses Glucosid jedoch die Struktur **14** haben, und es dürfte sich somit um Tuliposid A handeln.

Auch die Strukturvorschläge für das Narthesid (**3**) und das Glucosid aus *Mespillus germanica* L. **4** erscheinen korrekturbedürftig. Die Eigenschaften wären in beiden Fällen besser bei einer Struktur als 1-Acyl- oder 6-Acylderivat der betreffenden Hydroxysäure zu verstehen.

Die Glucoside Tuliposid A und B zeigen eine bemerkenswert starke antibakterielle und fungicide Wirksamkeit. Das steht im Gegensatz zu einigen der bisher isolierten glykosidischen Vorläufer der entsprechenden aktiven Lactone, die keine Aktivität zeigen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen inaktiven Glykosiden um Umwandlungsprodukte von ursprünglich vorhandenen Acylglykosiden. In der Tab. 3 ist die biologische Aktivität der Verbindungen **14**, **15**, **5** und **6** aufgeführt.

Während die bei der alkalischen Spaltung der Tuliposide A und B entstandenen Säuren **8** und **9** keine nennenswerte biologische Aktivität aufweisen, zeigen die Lactone **5** und **6** neben einer antibakteriellen eine starke fungicide Wirksamkeit. Bei den Aktivitäten der 1-Tuliposide ist zu berücksichtigen, daß sie durch die biologisch inaktiven 6-Tuliposide verunreinigt sind. Sie zeigen eine gute antibakterielle

Tab. 3. Biologische Aktivität der isolierten Verbindungen (in γ /ccm)²⁰⁾

| Substanz | <i>Bacillus subtilis</i> ^{a)} | <i>Pythium debaryanum</i> ^{b)} |
|---|--|---|
| 1-Tuliposid A (14) *) | 100 | — |
| 1-Tuliposid B (15) *) | 40 | 25 |
| α -Methylen- γ -butyrolacton (5) | 200 | 38 |
| β -Hydroxy- α -methylene- γ -butyrolacton (6) | 100 | 12.5 |

Vollständige Wachstumshemmung im Reihenverdünnungstest

a) in Nährlösung nach l.c.²¹⁾, b) in Agar nach l.c.²²⁾.

*) Die Substanz enthält gewisse Mengen an Acylwanderungsprodukten.

und fungicide Wirksamkeit. Offenbar besitzen die Glucoside im Vergleich zu den zugehörigen Lactonen etwas stärker antibakterielle und die Lactone stärker fungicide Eigenschaften.

Der Mechanismus der Hemmwirkung ist nicht geklärt. Während bekannt ist, daß ungesättigte Lactone antimikrobielle Eigenschaften besitzen und diese auf eine Reaktion mit aktiven SH-Gruppen zurückgeführt wird²³⁾, zeigen die Säuren 8 und 9 keine Aktivität. Die Aktivität der 1-Tuliposide könnte in ihrer Natur als energiereiche Verbindungen zu suchen sein oder in der Tatsache, daß sie leicht eine Spaltung in das antibiotisch aktive Lacton und Glucose erleiden. In letzterem Falle wäre das Lacton der eigentliche Hemmstoff und das Glucosid nur die Vorstufe. Dabei bliebe offen, ob das Lacton erst innerhalb oder schon außerhalb des beeinflussten Mikroorganismus unter Beteiligung seines Enzymsystems gebildet wird²⁴⁾.

Wir danken der *Irga GmbH*, Grenzach, für eine Unterstützung dieser Arbeit, Frau *H. Kämmerer* für ihre unermüdlige und verständnisvolle Mitarbeit und Herrn Dr. *H.-W. Fehlhaber* für die Aufnahme und Interpretation der Massenspektren. Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und der *Stiftung Volkswagenwerk* sind wir für die zur Verfügung gestellten analytischen Geräte zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche

Allgemeines

Die Schmelzpunkte wurden nach Kofler in der Anordnung nach *Weygand* (Mikroskop-Heiztisch) bestimmt. Die IR-Spektren sind mit dem Perkin-Elmer, Modell 221 (mit Gitterprisma), die Kernresonanzspektren mit dem Varian A 60 und die Massenspektren mit dem MS 9 der A.E.I. und dem CEC Massenspektrometer Typ 21/110 B mit Feldionenquelle-Eigenbau¹²⁾ gemessen worden.

Zur analytischen und präparativen Gaschromatographie verwendete man das Modell F 7 (mit Integrator D 2) von Perkin-Elmer, zur Bestimmung der optischen Drehwerte das Polarimeter 141 von Perkin-Elmer.

Zur Säulenchromatographie benutzte man Munktell's Zellulosepulver Nr. 400, Elutionsgemisch Essigester/Pyridin/Wasser (3.6 : 1 : 1.15).

20) Die vorliegende Tabelle verdanken wir Herrn Priv.-Doz. Dr. *F. Schönbeck*, Institut für Pflanzenkrankheiten, Bonn, der freundlicherweise auch die biologische Auswertung unserer Substanzen und Fraktionen übernahm.

21) *H. Köhler*, Einführung in die Methoden der pflanzlichen Antibiotikaforschung, Akademie Verlag, Berlin 1956.

22) *F. Schönbeck*, *Z. Pflanzenkrankh.* **75**, 193 (1968).

23) *W. B. Geiger* und *J. E. Conn*, *J. Amer. chem. Soc.* **67**, 112 (1945).

24) *F. Schönbeck* und *C. Schroeder*, in Vorbereitung.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) führte man in der bei *Tschesche, Freytag* und *Snatzke*²⁵⁾ beschriebenen Form aus (Kieselgel G zur Dünnschichtchromatographie von Merck). Nach dem Trocknen (bei 150°, 5 Min.) sprühte man mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1 : 2) an und erreichte nach weiterem Erhitzen (5 Min.) eine Anfärbung der Substanzen.

Zur Papierchromatographie (absteigend) verwendete man das Papier von Schleicher & Schüll, Nr. 2043 b. Lösungsmittelsysteme (Volumenverhältnisse):

System B¹¹⁾: Essigester/Pyridin/Wasser (3.6 : 1 : 1.15)

System C²⁶⁾: n-Butanol/Wasser/CCl₄ (4 : 4 : 3).

Angefärbt wurden die Substanzen mit Anilinhydrogenphthalat nach *Partridge*²⁷⁾ und mit Silbernitrat in Aceton nach *Dedonder*²⁸⁾.

Extraktion der Tulpen

a) *Stengel und Blätter*: 35 kg Stengel und Blätter von 1200 Tulpen wurden nach Zerkleinern mit einem Ultraturax dreimal mit je 30 l 80proz. Methanol extrahiert. Die Auszüge engte man i. Vak. bei 40° soweit ein, bis alles Methanol vertrieben war. Zur Entfernung von Farbstoffen und Chlorophyll wurden die Wasserphasen mehrfach mit Cyclohexan und anschließend mit Chloroform durchgeschüttelt. Nach dem Einengen der Wasserphasen i. Vak. bei 40° bis zur Trockne wurden 1.938 kg eines honiggelben, sirupösen Rückstandes gewonnen.

b) *Stempel*: Die Stempel (385.4 g) von 1200 Tulpen zerkleinerte man mit einem Ultraturax und extrahierte sie zweimal mit je 1 l 80proz. Methanol. Nach Aufarbeitung analog a) erhielt man 30.1 g Extrakt-Rückstand.

Die Extrakte wurden im Reihenverdünnungstest gegen *Bacillus subtilis* getestet. Bei einer Konzentration von 400 γ/ccm zeigten die Stengel- und Blätterextrakte vollständige Wachstumshemmung, die Stempelextrakte bei 180 γ/ccm.

Isolierung der Tuliposide A und B

Aus dem Stengel- und Blätterextrakt: 7 g Extrakt, aufgezogen auf 20 g Zellulose, wurden an 600 g Zellulose mit System B chromatographiert. Für die Trennung des Tuliposids A von den übrigen Substanzen war es wichtig, eine kurze Säule mit großem Querschnitt zu verwenden und mit hoher Durchlaufgeschwindigkeit zu betreiben (ca. 1 l/Stde.). Nach üblicher Aufarbeitung konnten 720 mg (10%) chromatographisch sauberes Tuliposid A als farbloser Sirup gewonnen werden, $[\alpha]_D^{20}$: +64° (c = 1.0, Wasser). — UV (H₂O): Schulter 207 mμ (ε = 17000). — IR (CHCl₃): CO 1705, C=C 1628/cm. — NMR: s. Tab. 1.

Daneben wurden 260 mg Tuliposid B (4%) chromatographisch einheitlich gewonnen.

Eine vollständige Wachstumshemmung gegen *B. subtilis* und *B. mycoides* wurde durch Tuliposid A (**14**) bei einer Konzentration von 100 γ/ccm erreicht. Während des Aufbewahrens trat rasch Inaktivierung von **14** ein. Nach 4 Wochen bei -20° war der Aktivitätswert auf 400 γ/ccm gesunken.

6-Tuliposid A (**14b**): Nach dreimaliger Säulenchromatographie von 2 g beim Aufbewahren entstandenem inaktivem Tuliposid A an 100 g Kieselgel mit wassergesätt. Essigester/Isopropylalkohol (3 : 1) erhielt man 1.2 g eines farblosen Öls, das nach zwei Tagen zu einer kristallinen Masse erstarrte. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Äthanol/Essigester

²⁵⁾ R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

²⁶⁾ R. Tschesche und G. Wulff, Tetrahedron [London] **19**, 621 (1963).

²⁷⁾ S. M. Partridge, Nature [London] **164**, 443 (1949).

²⁸⁾ R. Dedonder, Bull. Soc. chim. France **1952**, 874.

Schmp. 128°, $[\alpha]_D^{25}$: +45.5° ($c = 1.0$, Methanol). — Eine vollständige Wachstumshemmung gegen *B. subtilis* und *B. mycoides* wird durch das kristalline 6-Tuliposid A bei etwa 1200 γ /ccm erreicht. — NMR (D_2O , externer Standard TMS = 10): 1 H τ 3.56 (s); 1 H 4.10 (d; $J = 1.0$ Hz); 1 H 4.65 (d; 3); 2 H 6.13 (t; 6.5); 2 H 7.30 (t; 6.5); 6 Zuckerprotonen 5.00–7.00. — Massenspektrum (Feldionisation): m/e 279 ($M^+ + 1$) (15%); 261 ($M^+ + 1 - H_2O$) (15%); 213 (11%); 197 (100%); 188 (30%).

$C_{11}H_{18}O_8$ (278.2) Ber. C 47.48 H 6.48 Gef. C 47.84 H 6.67

Aus dem Stempelextrakt: 8 g Extrakt-Rückstand wurden auf 25 g Zellulose aufgezogen und an 600 g Zellulose mit System B chromatographiert. Dabei gewann man 2.5 g Tuliposid A (30%) und 1.5 g B (20%). — Tuliposid B: Farbloser Sirup; $[\alpha]_D^{25}$: +56° ($c = 1.0$, Wasser). — UV (H_2O): Schulter 212 $m\mu$ ($\epsilon = 17000$). — IR ($CHCl_3$): 1708, 1628/cm. — NMR: siehe Tab. 1. — Tuliposid B zeigte vollständige Wachstumshemmung gegen *B. subtilis* und *B. mycoides* bei einer Konzentration von 40 γ /ccm.

Acetylierung von Tuliposid A: 100 mg 14 in 2 ccm Pyridin versetzte man mit 1 ccm Acetanhydrid und ließ über Nacht bei Raumtemp. stehen. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 155 mg Penta-O-acetyl-tuliposid A (17) erhalten. NMR ($CDCl_3$): $\tau = 7.80$ –7.95 Signale entsprechend 14 Protonen = 4.8 Acetylgruppen.

Saure Hydrolyse von Tuliposid A: 280 mg antibiotisch aktives Tuliposid A wurden in 10 ccm wäbr. $n/2$ HCl 2 Stdn. auf 100° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde viermal mit je 20 ccm CH_2Cl_2 extrahiert. Man trocknete mit Na_2SO_4 und engte die vereinigten CH_2Cl_2 -Phasen ein. Rückstand: 90 mg α -Methylen- γ -butyrolacton (5). — NMR: s. Tab. 1. — IR ($CHCl_3$): C=O 1760, C=C 1662/cm. — Massenspektrum mit Hochauflösung: $M^+ = 98.0368$, ber. für $C_5H_6O_2$ 98.0368.

Alkalische Hydrolyse von Tuliposid A: Je 300 mg 1-Tuliposid A (14a) und 6-Tuliposid A (14b) wurden in 5 ccm wäbr. $n/2$ Ba(OH)₂ gelöst und über Nacht stengelassen. Nach Ansäuern auf pH 3 wurde mit NaCl gesättigt und 10mal mit je 70 ccm Äther extrahiert. Die Ätherphasen wurden vereinigt, getrocknet und bis zur Trockne eingengt: 100 bzw. 105 mg γ -Hydroxy- α -methylen-buttersäure (8), die nach dreimaligem Umkristallisieren aus Chloroform den Schmp. 65° zeigte. — NMR: s. Tab. 1. — Massenspektrum (Elektronenstoß): Basispeak bei m/e 68 ($M^+ - H_2O - CH_2O$); Peak der höchsten Masse bei 98 ($M^+ - H_2O$) (70%); Feldionisation: $m/e = 117$ ($M^+ + 1$) (100%); 116 (M^+) (16%); 99 ($M^+ + 1 - H_2O$) (27%).

$C_5H_8O_3$ (116.1) Ber. C 51.72 H 6.90 Gef. C 51.63 H 7.09

Saure Hydrolyse von Tuliposid B: 200 mg Tuliposid B wurden in 10 ccm wäbr. $n/2$ HCl 2 Stdn. auf 100° erhitzt. Nach dem Abkühlen sättigte man mit NaCl und extrahierte 20mal mit je 15 ccm Äther. Die Ätherphasen wurden vereinigt, getrocknet und der Äther unter Normaldruck auf dem Wasserbad bei 50° abdestilliert. Rückstand: 60 mg β -Hydroxy- α -methylen- γ -butyrolacton (6); $[\alpha]_D^{25}$: -82° ($c = 1.0$, Chloroform). — NMR: s. Tab. 1. — Massenspektrum (Feldionisation): $m/e = 115$ ($M^+ + 1$). — CD (Isooctan): 212 $m\mu$ ($\Delta\epsilon = -0.0472$); 207 ($\Delta\epsilon = -0.0591$).

$C_5H_6O_3$ (114.1) Ber. C 52.63 H 5.26 Gef. C 52.43 H 5.37

Alkalische Hydrolyse von Tuliposid B: 150 mg Tuliposid B wurden in 10 ccm wäbr. $n/2$ Ba(OH)₂ über Nacht stengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung konnten 49 mg β , γ -Dihydroxy- α -methylen-buttersäure (9) erhalten werden. Aus Chloroform farblose Nadeln vom Schmp. 114–115°; $[\alpha]_D^{25}$: +14.7° ($c = 1.0$, Methanol). — NMR: s. Tab. 1. — Massenspektrum (Feldionisation): $m/e = 133$ ($M^+ + 1$) (100%); 115 ($M^+ + 1 - H_2O$) (11%);

Elektronenstoß: $m/e = 96$ ($M^+ - 2 H_2O$) (62%); 84 ($M^+ - H_2O - CH_2O$) (100%). — CD (Dioxan): 260 $m\mu$ ($\Delta\epsilon = -0.536$); 229 ($\Delta\epsilon = -0.274$).

$C_5H_8O_4$ (132.1) Ber. C 45.45 H 6.06 Gef. C 45.53 H 6.06

Bestimmung der Absolutkonfiguration von β -Hydroxy- α -methylen- γ -butyrolacton (6)

Gewinnung von 6: 200 g Tulpenstempel wurden in 400 ccm 80proz. Methanol mit dem Ultraturax zerkleinert. Nach 1 Stde. filtrierte man und engte bei 30° i. Vak. auf 300 ccm ein. Die Lösung wurde dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt und anschließend bis zur Entfernung des Methanols auf etwa 200 ccm eingengt. Der pH-Wert der Lösung betrug 6. Man ließ die Lösung 24 Stdn. bei 40° stehen und schüttelte anschließend fünfmal mit Äther aus. Die äther. Lösung wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Man erhielt etwa 2 ccm einer wäbr. Lösung der Lactone, die auf 10 g SiO_2 aufgezogen wurden. Nach Chromatographie an einer Säule von 40 g SiO_2 erhielt man 22 mg **5** und 52 mg **6** in dünn-schichtchromatographisch einheitlicher Form (DC an Kieselgel G mit Benzol/Äther 1:1, Detektion mit dem Reagenz von Kedde²⁹); R_F 0.42 für **5** und 0.24 für **6**. **6** wurde durch NMR-Vergleich mit authent. Substanz identifiziert.

Darstellung der Pyrazolinderivate: 50 mg **6** wurden in 5 ccm Äther mit einem Überschuß von Diazomethan in Äther 15 Min. bei Raumtemp. stehengelassen. Anschließend engte man die Lösung ein. Dünn-schichtchromatographie mit Benzol/Äther (1:1) zeigte nach Detektion mit Kedde-Reagenz und anschließend mit Chlorsulfonsäure/Eisessig zwei intensiv gelborangefarbene Flecke mit R_F 0.26 und 0.15 im Verhältnis etwa 3:1. Die beiden Substanzen wurden an SiO_2 mit Äther/Benzol (1:1) aufgetrennt, wobei beide Substanzen chromatographisch rein und kristallisiert erhalten wurden.

Die unpolare Hauptsubstanz **7a** zeigte den Schmp. 69.5–70° (lange Nadeln aus Äther/Hexan). — Massenspektrum (Hochauflösung): $M^+ = 156.0535$, ber. für $C_6H_8N_2O_3$ 156.0535; $m/e = 156$ (M^+) (0.9%); 128 ($M^+ - N_2$) (14%); 111 ($M^+ - N_2 - OH$) (48%); 98 ($M^+ - N_2 - CH_2O$) (54%); 70 ($M^+ - N_2 - COOCH_2$) (100%); 69 (99%). — IR (0.5 mg/6 ccm CCl_4): Freies OH bei 3618/cm. — CD (1.58 mg/2.247 g Äthanol): 323 $m\mu$ ($\Delta\epsilon = -7.66$); 232 ($\Delta\epsilon = -5.12$); 205 ($\Delta\epsilon = +2.8$).

Die polare Nebensubstanz **7b** (feine Nadeln aus Äther) schmolz bei 128.5–131° unter N_2 -Entwicklung. — Massenspektrum (Hochauflösung): $M^+ = 156.0533$, ber. für $C_6H_8N_2O_3$ 156.0535; $m/e = 156$ (M^+) (1.4%); 128 ($M^+ - N_2$) (8%); 111 ($M^+ - N_2 - OH$) (44%); 98 ($M^+ - N_2 - CH_2O$) (43%); 70 ($M^+ - N_2 - COOCH_2$) (100%); 69 (98%). — IR (0.2 mg/6 ccm CCl_4): Schwache interne Wasserstoffbrücke bei 3571/cm. — CD (0.45 mg/2.229 g Äthanol): 324 $m\mu$ ($\Delta\epsilon = +8.76$); 236 ($\Delta\epsilon = +3.26$); 206 ($\Delta\epsilon = -3.9$).

Enzymatische Spaltung von Tuliposid A: 300 mg Tuliposid A wurden in 20 ccm Wasser mit 5 Tropfen Schnecken-Enzym aus *Helix pomatia* (der Fa. Industrie Biologique Française, Gennevilliers) versetzt. Nach drei Tagen wurde auf pH 3 angesäuert und wie üblich aufgearbeitet. Man erhielt 80 mg γ -Hydroxy- α -methylen-buttersäure (**8**) vom Schmp. 65°.

Belichtungsversuche mit Tuliposid A: 6 Proben mit je 15 mg Tuliposid A, im Winter aus Treibhaustulpen gewonnen, wurden in je 10 ccm Wasser 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Min. mit UV-Licht (254 $m\mu$) bestrahlt. Anschließend testete man die belichteten Proben gegen *B. subtilis*. Das Maximum der Photoaktivierung von A lag bei einer Belichtungszeit von 6 Min.: Aktivitätswert 120 γ /ccm (vor der Bestrahlung 350 γ /ccm), $[\alpha]_D^{20}$: +68° ($c = 0.15$, Wasser) (vor der Bestrahlung: $[\alpha]_D^{20}$: +35° ($c = 0.15$, Wasser)).

²⁹) J. E. Bush und D. A. H. Taylor, Biochem. J. **52**, 643 (1952).

Hydrierung von Tuliposid A: 1 g PtO_2 , in 30 ccm Methanol suspendiert, wurden mit H_2 zu Pt reduziert. Man fügte anschließend eine Lösung von 2.8 g *Tuliposid A* in 30 ccm Methanol hinzu und hydrierte bis zur konstanten Wasserstoffaufnahme (230 ccm). Nach Abfiltrieren von Pt und Abdampfen des Methanols wurden 2.7 g Hydrierungsprodukt erhalten. — NMR (D_2O): keine Methylenprotonen bei $\tau = 3.70$ und 4.25 mehr.

Saure Hydrolyse von hydriertem Tuliposid A: 1.5 g Hydrierungsprodukt wurden in 50 ccm wäbr. *Salzsäure* 2 Stdn. auf 100° erhitzt. Man ließ erkalten und extrahierte dreimal mit je 60 ccm Methylenchlorid. Nach Trocknen wurde das CH_2Cl_2 bei Normaldruck und 55° auf dem Wasserbad abdestilliert. Zurück blieben 500 mg eines aromatisch riechenden, leicht flüchtigen Öls, das nach der qualitativen und quantitativen Gaschromatographie auf einer analytischen Säule (Polypropylenglykol 15% auf Celite 545, 120° , 20 ccm $N_2/Min.$) aus zwei Substanzen im Mengenverhältnis 10:1 besteht. Sie wurden präparativ gaschromatographisch (Polypropylenglykol 20% auf Chromosorb R; Länge 2.7 m; \varnothing 21 mm, 120 ccm $N_2/Min.$) getrennt. — NMR-Spektrum des in größerer Menge vorliegenden α -Methyl- γ -butyrolactons (**10**): 2 H $\tau = 5.70$ (m), 2 H und 1 H 7.20–8.30 (m); 3 H 8.70 (d; $J = 6.5$ Hz). — IR ($CHCl_3$): C=O 1765/cm. — Massenspektrum (Hochauflösung): $M^+ = 100.0525$, ber. für $C_5H_8O_2$ 100.0524.

Massenspektrum der zweiten Verbindung: $M^+ = 98.0368$, ber. für $C_5H_6O_2$ 98.0368.

Diese Substanz ist ein Gemisch aus α -Methylen- γ -butyrolacton (**5**) (60%) und 2-Methylbuten-(2)-olid-(4.1) (**11**) (40%), wie sich aus dem NMR-Spektrum und durch Trennung mit Hilfe der Gaschromatographie auf Kapillarsäulen (50-m-Stahlsäule, \varnothing 0.5 mm, Polypropylenglykol) ergibt. Neben den Protonen von **5** fanden sich im NMR-Spektrum ($CDCl_3$) die von **11**: 1 H $\tau = 2.82$ (m); 2 H 5.20 (m) und 3 H 8.03 (m). IR ($CHCl_3$): C=O 1760, 1715/cm.

Alkalische Hydrolyse von hydriertem Tuliposid A: 1.5 g Hydrierungsprodukt wurden in 50 ccm wäbr. $n/2$ $Ba(OH)_2$ über Nacht stehengelassen. Nach Ansäuern auf pH 3 wurde bis zur Sättigung NaCl hinzugefügt, 10 mal mit je 50 ccm Äther extrahiert und nach Trocknen der vereinigten Auszüge der Äther unter Normaldruck bei 50° auf dem Wasserbad abdestilliert. Zurück blieben 600 mg eines lackartigen Materials, das in 20 ccm Wasser gelöst und fünfmal mit je 30 ccm Methylenchlorid extrahiert wurde.

Die vereinigten Auszüge wurden bis zur Trockne eingengt: Rückstand 30 mg. Bei -20° kristallisierten leicht gelb gefärbte Kristalle aus. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Chloroform 17 mg farblose feine Nadeln vom Schmp. $80-81^\circ$. — NMR (D_2O): 1 H $\tau = 3.08$ (m); 2 H $\tau_A = 5.52$ (d; 1); $\tau_B = 5.63$ (d; 1), $J_{AB} = 6.5$ Hz; 3 H 8.12 (d; 1), übereinstimmend mit dem Spektrum der nach l. c.¹⁶⁾ synthetisch hergestellten γ -Hydroxy-tiglinsäure (**13**). Auch Schmp., Misch-Schmp. und IR-Spektren erwiesen die Identität der Verbindungen.

Die Wasserphase wurde ebenfalls bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand betrug 570 mg. NMR ($CDCl_3$): 2 H und 1 H $\tau = 7.20-8.60$; 2 H 6.33 (t; $J = 6.5$ Hz) und 3 H 8.85 (d; 3.2) neben den in geringer Intensität vorliegenden Signalen von **8**.

Verknüpfungsstelle der Aglykone mit der D-Glucose in den Tuliposiden A und B

Umsetzung mit 3,4-Dihydro-2H-pyran: Man löste je 300 mg inaktives *Tuliposid A* und aktives *Tuliposid B* in 3 ccm Dimethylsulfoxid (DMSO) und versetzte nach Hinzufügen von je 2 ccm *Dihydropyran* mit je 2 Tropfen konz. *Salzsäure*. Anschließend wurde 15 Stdn. bei Raumtemp. unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Dann fügte man je 100 ccm Chloroform hinzu, wusch die Chloroformphasen zur Entfernung von DMSO fünfmal mit je 100 ccm

Wasser, trocknete sie und destillierte das Lösungsmittel ab. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel mit Cyclohexan/Aceton (5:1) wurden 504 mg **18** und 595 mg **16** erhalten, die im IR keine OH-Banden mehr aufwiesen.

Alkalische Abspaltung der Säurereste: Die Umsetzungsprodukte **18** und **16** wurden in je 10 ccm 4proz. methanol. KOH-Lösung 3 Stdn. auf 45° erhitzt. Nach dem Erkalten fügte man je 40 ccm Wasser hinzu, dampfte das Methanol ab und extrahierte die wäßr. Phasen dreimal mit je 50 ccm Chloroform. Die vereinigten Chloroformphasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Rückstand: 343 mg (aus **18**) und 350 mg (aus **16**).

Methylierung mit CH₃J/NaH¹⁷⁾: Die Hydrolysenprodukte wurden in je 10 ccm DMSO unter Feuchtigkeitsausschluß und Rühren innerhalb 1 Stde. je dreimal mit 170 mg NaH versetzt. Dann rührte man nach Zugabe von je 2 ccm CH₃J über Nacht. Der Ansatz wurde mit je 120 ccm Chloroform versetzt, die Lösung filtriert und das DMSO durch dreimaliges Waschen der Chloroformphasen mit je 100 ccm Wasser entfernt. Nach dem Trocknen wurde das Lösungsmittel abgedampft. Rückstände: 320 und 351 mg. — IR: keine OH-Banden.

Saure Abspaltung der Schutzgruppen: Die Methylierungsprodukte wurden in je 20 ccm Methanol mit je 0.5 ccm 1 n wäßr. HCl 3 Stdn. auf 45° erhitzt. Nach dem Erkalten wurden je 15 ccm Wasser hinzugefügt, das Methanol abgedampft und die Lösung mit Dowex-3 neutralisiert. Nach Einengen der Wasserphasen bis zur Trockne betrug die Rückstände 102 bzw. 104 mg.

Reinigung der Monomethylglucose: Die 102 mg Methylzuckergemisch aus Tuliposid A wurden auf 400 mg Kieselgel aufgezogen und an 20 g Kieselgel mit CHCl₃/Methanol (9:2) chromatographiert. Nach üblicher Aufarbeitung konnten 80 mg einer Monomethylglucose erhalten werden, die nach papierchromatographischer Analyse noch geringe Mengen an Glucose enthielt. Nach Animpfen mit synthetisch hergestellter 6-O-Methyl-D-glucose kristallisierte der Methylzucker aus. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Äthanol/Benzol (1:1) Schmp. 143–145°; $[\alpha]_D^{20}$: +100.8° (6 Min.) → +56.2° (24 Stdn.) (*c* = 1.0, Wasser). Die Substanz stimmte in allen untersuchten Eigenschaften mit der nach l.c.¹⁶⁾ dargestellten 6-Methyl-D-glucose überein.

Reinigung des Methylglucosids: Die 104 mg Hydrolyseprodukt aus Tuliposid B wurden an 18 g Kieselgel (71–100 μ) mit CHCl₃/Methanol (9:2) chromatographiert. Man erhielt 85 mg eines Methylglucosids, das sich aus viel Essigester kristallisieren ließ. Nach dreimaliger Umkristallisation Schmp. 104–105°, $[\alpha]_D^{20}$: –30° (*c* = 1.0, Wasser). Die Substanz war im chromatographischen Verhalten, IR-Spektrum, Schmp. und in der Drehung mit synthetisch nach l.c.³⁰⁾ hergestelltem Methyl- β -D-glucopyranosid identisch.

³⁰⁾ T. S. Patterson und J. Robertson, J. chem. Soc. [London] **1929**, 300.