

Rudolf Tschesche und Hans-Joachim Hoppe

Über Glykoside mit lacton-bildendem Aglykon, V<sup>1)</sup>

## Über Narthesid A und B, zwei diastereomere Lacton-Glucoside und ihr antibiotisch wirksames Aglykon aus Beinbrech (*Nartheicum ossifragum* Hud.)<sup>2)</sup>

Aus dem Institut für Organische und Biochemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 21. Juli 1971)

Aus den oberirdischen Pflanzenteilen des Beinbrech (*Nartheicum ossifragum* Hud.) wurde neben dem daraus bereits bekannten 2-Methoxy-buten-(2)-olid-(4.1) (**1**) ein racemisches Lacton **2** isoliert, das antibiotische Wirksamkeit gegen *Bacillus subtilis* zeigte. Die Struktur von **2** konnte als ( $\pm$ )-4-Hydroxy-3-methoxy-buten-(2)-olid-(4.1) bestimmt werden. Weiter fanden sich die Glucoside Narthesid A (**3**) und B (**5**), die nach enzymatischer Spaltung das gleiche Lacton **2** lieferten. Die Struktur des schon bekannten Narthesids A (**3**) konnte als (4*S*)-3-Methoxy-4- $[\beta$ -D-glucopyranosyloxy]-buten-(2)-olid-(4.1) gesichert werden. Narthesid B (**5**) ist das zu **3** diastereomere Glucosid mit (4*R*)-Konfiguration.

On Glycosides with Lactone-forming Aglycones, V<sup>1)</sup>

On Nartheside A and B, two Diastereomeric Lactone-Glucosides, and their Antibiotical Active Aglycone from Bog Asphodel (*Nartheicum ossifragum* Hud.)<sup>2)</sup>

From the above ground parts of Bog Asphodel (*Nartheicum ossifragum* Hud.) a racemic lactone **2** was isolated beside the known 2-methoxy-2-buten-4-olide (**1**). **2** produces antibiotal activity against *Bacillus subtilis*. The structure of **2** was determined as ( $\pm$ )-4-hydroxy-3-methoxy-2-buten-4-olide. Farther the glucosides nartheside A (**3**) and B (**5**) were found producing the same lactone **2** after enzymatic hydrolysis. Therefore the structure of the already known nartheside A (**3**) was to be secured as (4*S*)-3-methoxy-4-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-2-buten-4-olide. Nartheside B (**5**) is the glucoside diastereomeric to **3** with (4*R*)-configuration.

1953 beschrieb *Stabursvik*<sup>3)</sup> die Isolierung eines  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Lactons aus den blühenden, oberirdischen Pflanzenteilen von Beinbrech (*Nartheicum ossifragum* Hud., Liliaceae). Durch Synthese konnte er zeigen, daß der Verbindung die Struktur des 2-Methoxy-buten-(2)-olids-(4.1) (**1**) zukommt. 1959 veröffentlichte derselbe Autor<sup>4)</sup> die Isolierung eines antibiotisch inaktiven Glucosids, für das er den Namen Narthesid vorschlug. Er

<sup>1)</sup> IV. Mitt.: R. Tschesche, K. Struckmeyer und G. Wulff, Chem. Ber. **104**, 3567 (1971), vorstehend.

<sup>2)</sup> Auszug aus der Dissertation von H.-J. Hoppe, Univ. Bonn 1971.

<sup>3)</sup> A. Stabursvik, Acta chem. scand. **8**, 525 (1954).

<sup>4)</sup> A. Stabursvik, Norges Tek. Vitenskapskad., Ser. 2, **6**, 89 (1959), C. A. **55**, 14 599 (1961).

vermutete in Narthesid den glykosidischen Vorläufer von **1**, bei dem Glucose mit C-4 von **1** glykosidisch verknüpft sein sollte. Ein eindeutiger Strukturbeweis für die Position der Methoxy-Gruppe stand jedoch noch aus. Im Rahmen unserer Untersuchungen über antibiotisch aktive Inhaltsstoffe aus höheren Pflanzen<sup>5)</sup> haben wir die Arbeiten über Inhaltsstoffe des Beinbrechs erneut aufgenommen. Neben der antibiotischen Wirksamkeit interessierte die Struktur dieses Glucosids und der vermutete chemische Zusammenhang zwischen Lacton **1** und Narthesid.

Als Ausgangsmaterial wurden im August 1970 blühende Beinbrech-Pflanzen auf moorigen Gelände im Raume Monschau (Eifel) gesammelt. In dem wäßrigen Extrakt der getrennt aufgearbeiteten Stengel (mit Blüten) und der Blätter ließen sich papierchromatographisch mit dem Laufmittelsystem Essigester/Pyridin/Wasser (35 : 8 : 11)<sup>6)</sup> als Monosaccharide Glucose ( $R_G = 1$ ), Fructose ( $R_G = 1.4$ ) und wenig Xylose ( $R_G = 2.2$ ) nachweisen. Nach Anfärben des Chromatogramms mit dem Reagenz nach Dedonder<sup>7)</sup> (Silbernitrat mit Acteon) beobachtete man einen zusätzlichen Fleck ( $R_G = 3.3$ ), der Narthesid A (**3**) zugeordnet wurde. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung des wäßrigen Extraktes ergab jedoch, daß bei Anwendung spezieller Laufmittelsysteme [z. B. Isopropylalkohol/Chloroform (4:1)] der dem Glucosid zugeordnete Fleck neben Narthesid A (**3**) in wesentlich geringerer Konzentration eine zweite Komponente Narthesid B (**5**) enthielt. Nach Anreicherung zeigte sich, daß **5** papierchromatographisch mit dem erwähnten Pyridin-System der  $R_G$ -Wert 4.0 zukommt (alle  $R_G$ -Werte bezogen auf Glucose).

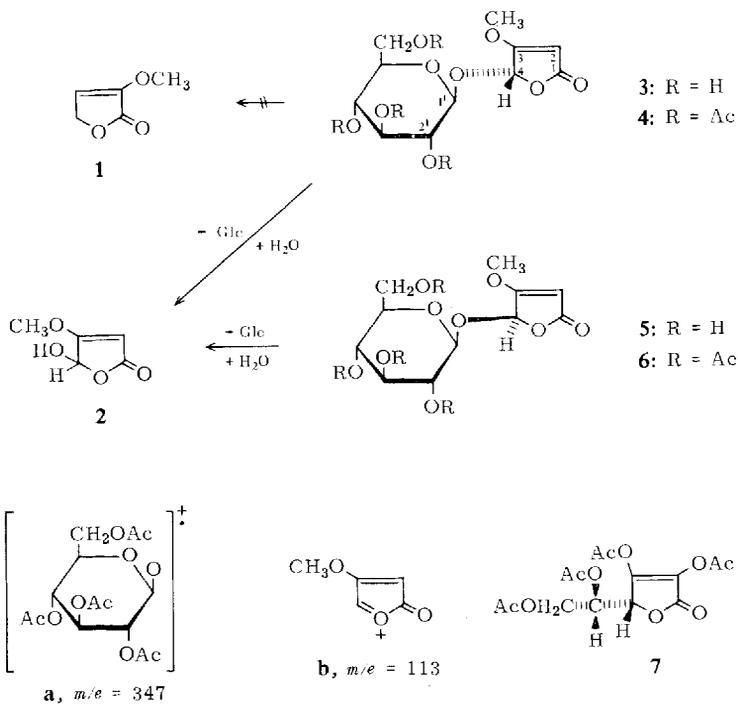
Zur Isolierung der gesuchten Verbindungen wurde das frische Pflanzenmaterial unter Zerkleinern mit Aceton extrahiert. Der Chloroform-Extrakt der nach Entfernen des Acetons wäßrigen Phase enthielt Lacton **1**, das nach chromatographischer Reinigung kristallin isoliert wurde. Der durch Gefriertrocknung gewonnene Rückstand der wäßrigen Phase wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser (65 : 30 : 10)<sup>8)</sup> aufgetrennt. Hierbei erhielt man ein kristallines Lacton **2** und eine Glucosid-Fraktion, die Narthesid A (**3**) und B (**5**) im Verhältnis von 9:1 enthielt. Die Gesamtausbeute an Glucosid betrug 0.3%, bezogen auf frische Stengel mit Blüten. Narthesid A (**3**), das aus dem Gemisch teilweise auskristallisierte, und sein Tetraacetat **4** ist nach den angegebenen physikalischen Daten identisch mit der von *Stabursvik*<sup>4)</sup> isolierten Verbindung. Die Isolierung von Narthesid B (**5**) aus dem angereicherten Gemisch wurde zunächst dickschichtchromatographisch vorgenommen. Besser erfolgt die Trennung der Glucoside jedoch über ihre Acetate. So konnten aus dem Gemisch neben **4** das Tetraacetat **6** (aus **5**) durch Säulenchromatographie gewonnen werden. Die enzymatische Spaltung von **3** und **5** mit einer  $\beta$ -Glucosidase lieferte D-Glucose, die isoliert und papierchromatographisch sowie durch die optische Drehung identifiziert wurde, und Lacton **2**.

<sup>5)</sup> R. Tschesche, F.-J. Kämmerer und G. Wulff, Chem. Ber. **102**, 2057 (1969).

<sup>6)</sup> P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirota, G. Ruffini und A. Sartori, J. Chromatogr. [Amsterdam] **3**, 343 (1960).

<sup>7)</sup> R. Dedonder, Bull. Soc. chim. France **1952**, 874.

<sup>8)</sup> T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **11**, 1546 (1963), C. A. **60**, 11 850 (1964).



Die Strukturen der Verbindungen **1** bis **6** wurden durch IR-, NMR- und hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt. Das Massenspektrum von **1** weist ein Molekül-Ion ( $m/e$  114) mit der Elementarzusammensetzung  $C_5H_6O_3$  auf. Aus dem IR-Spektrum (in Chloroform) ließ sich eine intensive Carbonyl-Bande bei 1765 sowie eine scharfe Bande bei 1650/cm entnehmen, die einer konjugierten C=C-Valenzschwingung zuzuordnen ist. Diese Absorptions-Banden sind für ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Fünfring-Lacton typisch. Eine  $\beta,\gamma$ -ständige Doppelbindung ist auszuschließen, da für diesen formalen Vinylester eine Carbonyl-Bande bei  $\sim 1800/cm$  zu erwarten ist<sup>9)</sup>. Das NMR-Spektrum von **1** (s. Tab.) legt die Position einer Methoxy-Gruppe an C-2 fest, da nur so die beobachtete vicinale Kopplung  $J_{3,4} = 2.0$  Hz möglich wird. Die spektroskopischen Daten bestätigen daher die schon von *Stabursvik*<sup>3)</sup> angegebene Struktur des Lactons **1** als 2-Methoxy-buten-(2)-olid-(4.1).

Bei **2** findet man im Massenspektrum ein Molekül-Ion ( $m/e$  130) mit der Summenformel  $C_5H_6O_4$ . Die Carbonyl-Doppelbande bei 1750 und 1730 sowie eine scharfe Bande einer konjugierten C=C-Valenzschwingung bei 1630/cm im IR-Spektrum (in KBr) deuten wie bei **1** auf ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Fünfring-Lacton hin, bei dem die Aufspaltung der Carbonyl-Bande durch ein vorhandenes C-2-Proton zu erklären wäre<sup>10)</sup>. Weiterhin entnimmt man dem IR-Spektrum eine breite Bande zwischen 3400 und 3200/cm, die auf eine (intermolekular assoziierte) OH-Gruppe hinweist. Das NMR-Spektrum von **2** zeigt unter anderem das Signal einer Methoxy-Gruppe und schließt

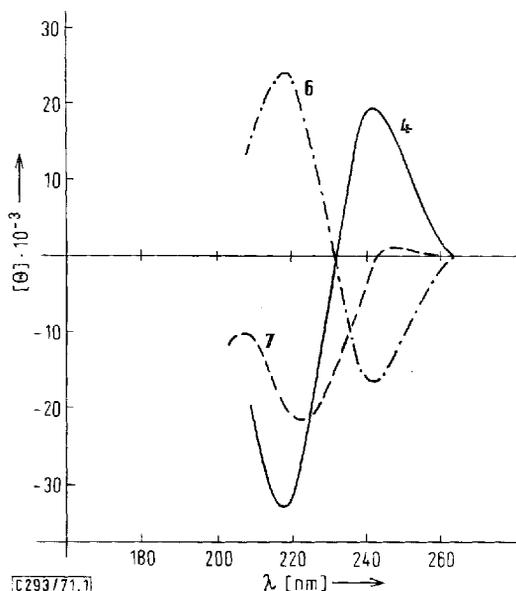
<sup>9)</sup> L. J. Bellamy, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, S. 148, Steinkopff Verlag, Darmstadt 1966.

<sup>10)</sup> R. N. Jones, C. L. Angell, T. Ito und R. J. D. Smith, J. Canad. Chem. 37, 2007 (1959).

vicinale Protonen durch fehlende Kopplung aus. Aus der chemischen Verschiebung der Methoxy-Gruppe mit  $\tau$  5.55 kann durch Vergleich mit Lacton **1** geschlossen werden, daß zwischen den beiden noch möglichen Positionen der Methoxy-Gruppe (C-3 bzw. C-4) als Vinyläther nur C-3 des Lactonringes in Frage kommt. Damit befindet sich die OH-Gruppe an C-4. Das aus der Pflanze und durch enzymatische Spaltung von Narthesid A (**3**) und B (**5**) gewonnene Lacton **2** zeigt keine optische Drehung und muß daher auf Grund des chiralen Zentrums an C-4 als Racemat angesehen werden. Die leichte Racemisierbarkeit ist ein zusätzlicher Hinweis für die angegebene Substituentenverteilung, da nur eine freie OH-Gruppe an C-4 eine Racemisierbarkeit über die Aldehyd-Form des geöffneten Lactonringes erklärt. Lacton **2** ist daher ( $\pm$ )-4-Hydroxy-3-methoxy-buten-(2)-olid-(4.1).

Die Massenspektren der Acetate **4** und **6** (aus **3** und **5**) weisen eine identische Peakverteilung auf. Man findet in geringer Intensität die für Tetra-*O*-acetyl-glucoside typischen Peaks bei  $m/e$  331, 242, 200, 169, 157, 145, 115, 109, 103 und 98<sup>11)</sup>. Weiterhin wird in relativ großer Intensität das Fragment-Ion **a** ( $m/e$  347) gefunden, das durch Abspaltung des Lacton-Radikals entsteht. Das durch Abspaltung des Aglykon-Teils gebildete Oxonium-Ion **b** ( $m/e$  113) stellt gleichzeitig den intensivsten Peak des Spektrums dar.

Als Peak höchster Masse mit  $m/e$  400 findet man ein Fragment, das durch einfache Abspaltung von Essigsäure aus **4** bzw. **6** entsteht. Im höheren Massenbereich erscheinen vor allem Folge-Ionen aus **a** und Bruchstücke geringer Intensität, die durch mehrfache Essigsäure-Abspaltung aus dem Peak höchster Masse gebildet werden.



Abbild. CD-Spektren von **4** und **6** in Äthanol, **7** (nach Boll)<sup>12)</sup> in Methanol

11) K. Heyns, H.-F. Grützmacher, H. Scharmann und D. Müller, Fortschr. chem. Forsch. **5**, 448 (1966).

12) P. M. Boll, Acta chem. scand. **22**, 3245 (1968).

Die NMR-Spektren von **3**, **4** und **6** (s. Tab.) zeigen neben den Signalen für die Protonen des Glucose-Teils die Singulets der Aglykon-Protonen wie sie auch für Lacton **2** gefunden wurden. Die Spektren der Acetate **4** und **6** weisen die Signale von je 4 Acetyl-Gruppen auf [**4**:  $\tau$  7.90 (s, 3); 7.93 (s, 3); 7.97 (s, 3); 7.99 (s, 3) und **6**:  $\tau$  7.90 (s, 3); 7.97 (s, 6); 7.99 (s, 3)]. Die  $\beta$ -glykosidische Verknüpfung bei beiden Glucosiden wird außer durch die enzymatische Spaltung auch durch die beobachtete Aufspaltung von ca. 7 Hz des Signals des 1'-H des Glucose-Teils mit dem des 2'-H festgelegt, da eine Kopplungskonstante dieser Größe für ein  $\beta$ -Glucosid mit *trans*-diaxialen 1'-H und 2'-H zu erwarten ist<sup>13)</sup>. Eine deutliche Unterscheidung der Spektren von **4** und **6** wird nur in der chemischen Verschiebung des Signals des Protons an C-1' des Zuckerteils und derjenigen des C-4-Protons am Aglykon bei **6** um ca. 0.15 ppm zu tieferem Feld im Vergleich zu **4** gefunden.

Tab. Protonenresonanzen von **1**, **2**, **3**, **4** und **6** ( $\tau$ -Werte,  $J$  in Hz) \*)

	2-H	3-H	4-H	OCH <sub>3</sub>	1'-H
Lacton <b>1</b>	—	3.08 (t, 1) $J_{3,4} = 2.0$	4.73 (d, 2) $J_{4,3} = 2.0$	5.77 (s, 3)	—
Lacton <b>2</b>	4.16 (s, 1)	—	3.47 (s, 1)	5.55 (s, 3)	—
Narthesid A ( <b>3</b> )	4.71 (s, 1)	—	3.67 (s, 1)	6.33 (s, 3)	4.85 (d, 1) $J_{1',2'} = 6.5$
Tetra- <i>O</i> - acetat <b>4</b> **)	4.85 (s, 1)	—	4.19 (s, 1)	6.09 (s, 3)	5.17 (d, 1) $J_{1',2'} = 6.5$
Tetra- <i>O</i> - acetat <b>6</b> **)	4.87 (s, 1)	—	4.04 (s, 1)	6.07 (s, 3)	5.03 (d, 1) $J_{1',2'} = 7.0$

\*) TMS als interner/externer Standard,  $\tau = 10$  (Meßtemp. 35°), **1** und **2** in D<sub>2</sub>O, **3** in Pyridin-d<sub>5</sub>, **4** und **6** in CHCl<sub>3</sub> gemessen.

\*\*) **4** und **6** bei 90 MHz, alle anderen bei 60 MHz.

Die Interpretation der NMR-Spektren legt den Schluß nahe, daß sich Narthesid A (**3**) und B (**5**) in der Konfiguration des chiralen Zentrums C-4 des Aglykons unterscheiden. Den Beweis hierfür liefern die CD-Messungen. Die CD-Spektren von **4** und **6** (s. Abbild.) zeigen durch ihren nahezu spiegelbildlichen Verlauf, daß sich die beiden Diastereomeren im Aglykonteil wie Enantiomere verhalten. Weiterhin ermöglichen diese Messungen eine Zuordnung der absoluten Konfiguration der chiralen Zentren der Aglykone. Nach *Boll*<sup>12)</sup> läßt sich durch Vergleich der Cotton-Effekte von an C-4 chiralen Butenoliden eine unbekannte Konfiguration zuordnen. Als bekannte Vergleichsverbindung wählte er Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -ascorbinsäure (**7**). Danach ist Narthesid A (**3**) (4*S*)-3-Methoxy-4- $[\beta$ -D-glucopyranosyloxy]-buten-(2)-olid-(4.1) und Narthesid B (**5**) das analoge Glucosid mit (4*R*)-Konfiguration.

Normalerweise ist zu erwarten, daß die Biogenese von Naturstoffen zu stereospezifisch einheitlichen Produkten führt. Daher mußte geprüft werden, ob der Nachweis von Diastereomeren in Beinbrech als Folgeprodukte der Aufarbeitungsbedingungen angesehen werden muß. Hierzu wurde das Pflanzenmaterial mehrfach unter Variation des Lösungsmittels und des pH-Wertes zwischen stark sauer und neutral aufgearbeitet. Dünnschichtchromato-

<sup>13)</sup> J. M. van der Veen, J. org. Chemistry **28**, 564 (1963).

graphisch zeigte sich, daß stets beide Diastereomere nachweisbar waren. Um eine Isomerisierung von **3** in **5** (und umgekehrt) auszuschließen, wurde die Abhängigkeit der Stabilität der Glucoside in verschiedenen Lösungsmitteln bei verändertem pH-Bereich und unter Variation der Temperatur untersucht. Im stark sauren, wäßrigen Medium bei erhöhten Temperaturen wurde eine teilweise Hydrolyse der Glucoside beobachtet, jedoch in keinem Fall eine Umwandlung. Es kann daher als sicher gelten, daß Narthesid A und B in der Pflanze nebeneinander vorkommen.

Die antibiotische Prüfung ergab, daß Lacton **1** und die Glucoside **3** und **5** beim Reihenverdünnungstest gegen *Bacillus subtilis* bis 2000 mg/ccm keine Wachstumshemmung zeigten. Eine fungistatische Wirkung dieser Verbindungen gegen *Pythium debaryanum* konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Lacton **2** dagegen weist antibiotische Aktivität ab ca. 100 µg/ccm gegen *Bacillus subtilis* auf. Eine deutliche Wachstumshemmung beim Bio-Test<sup>14)</sup> gegen *Pythium debaryanum* von 28% konnte erst bei 400 µg/ccm beobachtet werden. Es ist anzunehmen, daß **2** die von *Stabursvik*<sup>4)</sup> beschriebene antibiotische Wirksamkeit des Pflanzenextraktes von Beinbrech hervorruft.

Herrn Prof. Dr. F. Schönbeck, Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Bonn, danken wir für die mikrobiologischen Untersuchungen sowie Herrn Prof. Dr. G. Snatzke für die Anfertigung der CD-Spektren und Herrn Dr. H.-W. Fehlhaber für die Aufnahme der Massenspektren. Herrn Prof. Dr. G. Wulff danken wir für wertvolle Anregungen. Dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen sind wir für die finanzielle Unterstützung dankbar. Für die zur Verfügung gestellten Spektrometer danken wir der Stiftung Volkswagenwerk und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, H.-J. Hoppe dankt dem Kultusministerium des Landes Nordrhein-Westfalen für ein Promotionsstipendium.

## Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden nach Kofler in der Anordnung nach Weygand (Mikroskop-Heiztisch) bestimmt. Die IR-Spektren wurden mit dem Perkin-Elmer Modell 221, die NMR-Spektren mit den Geräten Varian A 60 beziehungsweise Spektrospin (90 MHz), die Massenspektren mit dem CH 4 der M. A. T. bei einer Elektronenenergie von 70 eV und dem MS 9 der A. E. I. (Hochauflösung) gemessen. Zur Bestimmung der optischen Drehwerte verwendete man das Polarimeter 141 von Perkin-Elmer, und die CD-Messungen wurden mit dem Dichrograph II von Roussel-Jouan, Paris, durchgeführt. Die C,H-Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium der Fa. Dr. F. Pascher, Bonn, angefertigt.

Zur Säulenchromatographie (SC) benutzte man ungesiebtes Kieselgel der Fa. Gebr. Hermann, Köln. Für die Trennung kamen folgende Laufmittelsysteme zur Anwendung: System A: CHCl<sub>3</sub>/Methanol/Wasser (65:30:10)<sup>8)</sup> (untere Phase); System B: CHCl<sub>3</sub>/Methanol/Wasser (65:40:10)<sup>8)</sup>; System C: Isopropylalkohol/CHCl<sub>3</sub> (4:1); System D: CCl<sub>4</sub>/Dioxan (2:1); System E: Benzol/Aceton (8:1); System F: Benzol/Aceton (5:1).

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde in der bei Tschesche, Freytag und Snatzke<sup>15)</sup> beschriebenen Form (Kieselgel G zur DC von Merck) durchgeführt. Nach dem Trocknen sprühte man mit Chromschwefelsäure (5 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> in 100 ccm konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) an und erreichte nach 5minütigem Erhitzen auf 150° eine Anfärbung aller Verbindungen. Speziell **1** wurde mit dem Hydroxylamin-Eisen(III)-chlorid-Reagenz nach Whittaker<sup>16)</sup> angefärbt.

<sup>14)</sup> F. Schönbeck, Z. Pflanzenkrankh. (Pflanzenpathol.) **75**, 193 (1968).

<sup>15)</sup> R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

<sup>16)</sup> V. P. Whittaker und S. Wijesundera, Biochem. J. **51**, 348 (1952).

Zur Papierchromatographie (PC) verwendete man das Papier von Schleicher & Schüll, Nr. 2043 b. Die Chromatogramme wurden absteigend entwickelt. Angefärbt wurde mit Anilinphthalat nach Partridge<sup>17)</sup> und AgNO<sub>3</sub> in Aceton nach Dedonder<sup>7)</sup>. Als Laufmittel diente das System G: Essigester/Pyridin/Wasser (35 : 8 : 11)<sup>6)</sup> (obere Phase, Laufzeit 10 Stdn.).

*2-Methoxy-buten-(2)-olid-(4.1)* (**1**): 550 g Stengel mit Blüten wurden unter Zerkleinern (Ultra-Turrax) zweimal mit je 2 l Aceton extrahiert. Anschließend filtrierte man vom Unge- lösten ab und engte die Lösung durch Abdampfen des Acetons i. Vak. (Badtemperatur 30°) ein. Die verbleibende wäßr. Phase wurde 15 Min. bei 5000 U/Min. zentrifugiert und vom abgeschiedenen Chlorophyll dekantiert. Danach extrahierte man 4 mal mit je 100 ccm Chloro- form und erhielt nach Einengen der vereinigten Chloroformphasen i. Vak. 3.2 g eines Roh- ekstraktes, der auf 6 g Kieselgel aufgezogen und mit dem System E an 300 g des gleichen Adsorbens säulenchromatographiert wurde. Das hierbei isolierte *Lacton 1* reinigte man von einem gelben Farbstoff durch erneute SC an Kieselgel mit dem System D und erhielt 289 mg **1** vom Schmp. 57° (farblose Prismen aus Äther).

IR (CHCl<sub>3</sub>): 1765 (C=O), 1660/cm (konj. C=C).

NMR: vgl. Tab.

MS: *m/e* 114 (87%, M<sup>+</sup>), 86 (51%), 85 (43%), 71 (89%), 57 (32%), 55 (25%), 43 (100%).

Die Elementarzusammensetzung des Molekular-Ions wurde durch Hochauflösung bestimmt.

C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (114.1) Ber. C 52.63 H 5.30 Gef. C 52.69 H 5.28

*(1)-4-Hydroxy-3-methoxy-buten-(2)-olid-(4.1)* (**2**): Im Anschluß an die Chloroform- extraktion (vgl. Isolierung von **1**) wurde die wäßr. Phase gefriergetrocknet und der erhaltene Rückstand (17 g) auf 35 g Kieselgel aufgezogen. Durch SC mit dem System A an 1.5 kg Kieselgel isolierte man *Lacton 2*, das erneut säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem System E gereinigt wurde. Man erhielt 198 mg **2** als farblose Prismen vom Schmp. 140° (aus Äther); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: 0° (c = 1.3, Wasser).

IR (KBr): 3500–3200 (assoziiertes OH), 1750, 1730 (C=O), 1635/cm (konj. C=C).

NMR: vgl. Tab.

MS: *m/e* 130 (17%, M<sup>+</sup>), 85 (16%), 84 (25%), 69 (100%), 44 (18%).

Die Elementarzusammensetzung des Molekular-Ions wurde durch Hochauflösung be- stimmt.

C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (130.1) Ber. C 46.16 H 4.65 Gef. C 46.22 H 4.56

*Narthesid A ((4S)-3-Methoxy-4-[β-D-glucopyranosyloxy]-buten-(2)-olid-(4.1), 3) und Narthesid B ((4R)-3-Methoxy-4-[β-D-glucopyranosyloxy]-buten-(2)-olid-(4.1), 5)*: Bei der SC des durch Gefrier Trocknung gewonnenen Rückstandes (vgl. Isolierung von **1** und **2**) an Kieselgel mit dem System A isolierte man 1.75 g eines Gemisches aus **3** und **5** (Gesamtaus- b. 0.3%). Aus wäßr. Aceton kristallisierten 0.65 g **3** als farblose Nadeln vom Schmp. 183–184° aus. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +27.6° (c = 3.0, Wasser); PC, System G: R<sub>G</sub> = 3.3 (bez. auf Glucose).

IR (Pyridin): 3500–3100 (assoziiertes OH), 1780, 1755 (C=O), 1640/cm (konj. C=C).

NMR: vgl. Tab.

CD (Äthanol): 240.5 nm, Δε = +6.46; 218.5 nm, Δε = –9.31.

C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub> (292.2) Ber. C 45.21 H 5.52 Gef. C 45.08 H 5.57

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

400 mg des angereicherten Gemisches von **3** und **5** wurden in 100-mg-Portionen dick-schichtchromatographisch an Kieselgel PF der Fa. Merck mit dem System C aufgetrennt. Die dem Glucosid **5** im UV-Licht zugeordnete Kieselgel-Zone eluierte man mit Methanol und zog den Rückstand des Eluats auf 100 mg Kieselgel auf. Nach SC über eine Filtrier-Säule mit 5 g desselben Adsorbens und Aceton als Laufmittel erhielt man 23 mg *Narthesid B* (**5**) als farbloses Öl. PC, System G:  $R_G = 4.0$  (bcz. auf Glucose).

IR (Pyridin): 3500–3100 (assoziertes OH), 1780, 1755 (C=O), 1640/cm (konj. C=C).

*2'.3'.4'.6'-Tetra-O-acetyl-narthesid A* (**4**) und *2'.3'.4'.6'-Tetra-O-acetyl-narthesid B* (**6**): 300 mg angereicherten Gemisches aus **3** und **5** (vgl. Isolierung von **3**) wurden in 6 ccm Pyridin mit 3 ccm *Acetanhydrid* über Nacht stehengelassen. Dann wurde in 20 ccm Eiswasser gegossen und 2 mal mit je 50 ccm Chloroform extrahiert. Die vereinigten Extrakte engte man 3 mal mit je 50 ccm Toluol im Rotationsverdampfer (Badtemperatur 35°) bis fast zur Trockne ein. Durch SC an Kieselgel mit dem System F wurden die *Acetate* **4** und **6** getrennt und durch anschließende fraktionierte Kristallisation aus Aceton/Petroläther von letzten Spuren der Mischkomponente gereinigt. Man erhielt 334 mg **4** und 61 mg **6**. (Die erhaltenen Mengen entsprechen unter Berücksichtigung der Anreicherung einem Verhältnis von 9 : 1 für **3** und **5**.)

*2'.3'.4'.6'-Tetra-O-acetyl-narthesid A* (**4**): Schmp. 195–196° (farblose Nadeln aus Aceton/Petroläther),  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-2.8^\circ$  ( $c = 1.35$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

IR (KBr): 1780, 1755, 1730 (C=O), 1650/cm (konj. C=C).

CD (Äthanol): 241.5 nm,  $\Delta\epsilon = +6.14$ ; 218.5 nm,  $\Delta\epsilon = -10.02$  (vgl. Abbild.).

NMR: vgl. Tab.

MS: *m/e* 400 (0.1%, M – AcOH), 347 (9%, a), 331 (0.3%), 242 (4.5%), 215 (9.2%), 200 (1.7%), 173 (12%), 169 (2%), 157 (7.5%), 145 (1.7%), 115 (10%), 113 (b, 100%), 109 (2.5%), 103 (2.4%), 98 (4.7%), 85 (20.5%).

Die Elementarzusammensetzung der Ionen wurde durch Hochauflösung bestimmt.

$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$  (460.4) Ber. C 49.56 H 5.22 Gef. C 49.75 H 5.36

*2'.3'.4'.6'-Tetra-O-acetyl-narthesid B* (**6**): Schmp. 147–148° (farblose Prismen aus Äther);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-55.2^\circ$  ( $c = 0.81$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

IR (KBr): 1780, 1755, 1730 (C=O), 1650/cm (konj. C=C).

CD (Äthanol): 241 nm,  $\Delta\epsilon = -5.55$ ; 219.5 nm,  $\Delta\epsilon = +7.27$  (vgl. Abbild.).

NMR: vgl. Tab.

MS: wie **4**.

$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$  (460.4) Ber. C 49.56 H 5.22 Gef. C 49.53 H 5.32

*Enzymatische Spaltung von 3 und 5*: 500 mg eines Gemisches aus **3** und **5** wurden in 50 ccm Wasser mit 0.2 mg  $\beta$ -Glucosidase (*Emulsin aus Mandeln*) versetzt. Mit verd. Salzsäure stellte man pH 5 ein, überschichtete die Lösung mit einigen Tropfen Toluol und ließ 2 Tage bei Raumtemp. stehen. Durch anschließende 16stdg. Perforation der Lösung mit Äther erhielt man nach Reinigung (vgl. Isolierung von **2**) 163 mg einer Verbindung, die in allen physikalischen Daten identisch mit Lacton **2** war.

Die wäbr. Phase wurde eingedampft und der Rückstand zur Isolierung der Glucose mit dem System B an Kieselgel chromatographiert. Man erhielt 210 mg *D-Glucose*. PC, System G:  $R_G = 1.0$ ,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+42^\circ$  ( $c = 1.40$ , Wasser).

*Variation der Aufarbeitungsmethode für 3 und 5:* 5 g Stengel mit Blüten wurden unter Zerkleinern (Ultra-Turrax) mit je 10 ccm Methanol, Aceton, Wasser und verd. Salzsäure (pH 5, pH 3 und pH 1) extrahiert. Vom Unlöslichen filtrierte man ab und trennte den Extrakt papier- und dünnschichtchromatographisch auf. Bei der PC mit System G wurden stets die gleichen Inhaltsstoffe nachgewiesen, die DC mit dem System C zeigte in allen Fällen das Vorhandensein von **3** und **5**.

*Versuche zur Isomerisierung von 3 und 5:* 10 mg von **3** (bzw. **5**) wurden in je 1 ccm Pyridin, Methanol, Wasser und verd. Salzsäure (pH 5, pH 3 und pH 1) gelöst und 1 Stde. auf 20°, 35° und 50° erwärmt. In allen Versuchen zeigte sich polarimetrisch und dünnschichtchromatographisch, daß keine Isomerisierung erfolgt war. Beim 4stdg. Erhitzen von **3** (bzw. **5**) in 5 ccm 0.5n HCl auf 80° trat teilweise Hydrolyse ein, jedoch keine Umwandlung.

[293/71]