

Rudolf Tschesche, Karin Welmar, Günter Wulff und Günther Snatzke

Über Glykoside mit lacton-bildendem Aglykon, VI¹⁾

Über Folgeprodukte einer unbekannt genauen Vorstufe des Ranunculins in Ranunculaceen

Aus dem Institut für Organische und Biochemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 27. September 1971)



Bei der Extraktion von *Ranunculus repens*- und *Helleborus foetidus*-Pflanzen mit Alkoholen erhielt man anstelle von Ranunculin die β -D-Glucopyranoside der zur Extraktion benutzten Alkohole. Bei der Aufarbeitung der Pflanzen nach Hill und van Heyningen entstand dagegen neben Ranunculin (1) ein Isomeres, als Isoranunculin bezeichnet, für das die Struktur eines 4- $[\beta$ -D-Glucopyranosyloxy]-penten-(2)-olids-(5.1) (4) bewiesen werden konnte. Die schonende Aufarbeitung mit Aceton/Wasser lieferte weder Ranunculin noch Isoranunculin; dafür wurden zwei neue Glykoside, Ranuncosid (5) und Ranunculosid (7), erhalten, deren Struktur bestimmt wurde. Alle 4 isolierten Glykoside 1, 4, 5 und 7 kommen als genuine Vorstufe des Protoanemonins nicht in Frage.

On Glycosides with Lactone-forming Aglycones, VI¹⁾

About Subsequent Products of a Still Unknown Genuine Precursor of Ranunculin in Ranunculaceae

The extraction of *Ranunculus repens* and *Helleborus foetidus* with alcohols yields instead of ranunculin the β -D-glucopyranosides of the alcohols used for extraction. By working up according to Hill and van Heyningen one gets ranunculin (1) and a new isomer, isoranunculin, for which the structure as 4-(β -D-glucopyranosyloxy)-2-penten-5-olide (4) could be established. Careful extraction with water/acetone yields neither ranunculin nor isoranunculin, but two new glycosides, ranuncoside (5) and ranunculoside (7), for which the structures were established. All the four isolated glycosides 1, 4, 5 and 7 are not concerned the genuine precursor of protoanemonin.



In vielen Arten der Gattungen *Ranunculus*, *Anemone* und *Clematis* (Familie *Ranunculaceae*) beobachtete man schon Mitte des vorigen Jahrhunderts eine stark haut- und augenreizende Substanz²⁾, die später als das γ -Lacton 2 (Protoanemonin) erkannt wurde³⁾. Die Verbindung ist ein unbeständiges Öl, das sich schnell zu dem kristallinen Dimeren Anemonin der Struktur 3^{3,4)} verändert. Protoanemonin besitzt eine erheb-

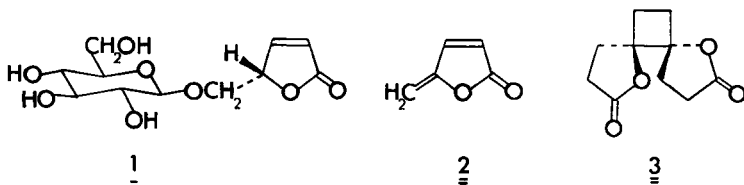
¹⁾ V. Mitteil.: R. Tschesche und H.-J. Hoppe, Chem. Ber. 104, 3573 (1971).

²⁾ J. Müller, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 113, 1 (1850).

³⁾ Y. Asahina und A. Fujita, Acta phytochim. [Tokyo] 1, 1 (1922); 712 (1922).

⁴⁾ R. M. Moriarty, C. R. Romain, J. L. Karle und J. Karle, J. Amer. chem. Soc. 87, 3251 (1965); J. L. Karle und J. Karle, Acta crystallogr. [Copenhagen] 20, 555 (1966); C. A. 64, 15116 (1966).

liche antibiotische Aktivität, Anemonin dagegen nicht⁵⁾. 1951 beschrieben *Hill* und *van Heyningen*⁶⁾ die Isolierung einer glykosidischen Vorstufe, Ranunculin (1), die bereits in Gegenwart von Natriumacetat oder durch Glucosidase in Protoanemonin und D-Glucose gespalten wurde. Im sauren Gebiet war Ranunculin dagegen relativ stabil. *Hellström*⁷⁾ und *Bredenber*⁸⁾ bestätigten diese Befunde, IR-Spektrum und Spaltung mit einer β -Glucosidase bewiesen die β -glykosidische Verknüpfung des Zuckers. Ferner klärten *Benn* und *Yelland*⁹⁾ die Stereochemie an C-4 im Aglykon als *S* und *Boll*¹⁰⁾ stützte dieses Ergebnis durch CD-Messungen. Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen an Pflanzen, die Glykoside mit lactonbildendem Aglykon enthalten und die zum Teil erhebliche antibiotische Fähigkeiten entfalten^{1,11)}, begannen wir eine Neuuntersuchung von Vertretern der Familie der *Ranunculaceae*, da uns durch die vorliegenden Arbeiten die Frage der genuinen Vorstufe des Protoanemonins nicht ausreichend geklärt erschien.



Wurden frische Pflanzen von *Ranunculus repens* oder *Helleborus foetidus*, die laut Literatur¹²⁾ 0.06% bzw. 1.4% Ranunculin enthalten sollen, mit wäßrigem Isopropylalkohol oder Methanol extrahiert, so erhielt man überraschenderweise kein Ranunculin, dafür aber die Alkylglucoside der betreffenden Alkohole, so Isopropyl- β -D-glucopyranosid bzw. Methyl- β -D-glucopyranosid. Da Ranunculin gegen Alkohole weitgehend beständig ist, dürften die Pflanzen dieses Glykosid nicht genuin enthalten¹³⁾, sondern wohl eine reaktive Vorstufe, die auch für die Bildung der Alkylglucoside verantwortlich ist.

Um diese Frage zu klären, wurden zunächst *Ranunculus repens* bzw. *Helleborus foetidus* genau nach den Angaben von *Hill* und *van Heyningen*⁶⁾ in wäßriger Lösung sauer extrahiert und das Ranunculin durch Aktivkohle-Adsorption abgetrennt. Die NMR-Spektroskopie dieser Fraktion zeigte im Bereich der vinyllischen Protonen neben den vom Ranunculin herrührenden noch die einer weiteren ungesättigten Verbindung im Verhältnis 2 : 1. Da eine chromatographische Trennung beider Verbindungen nicht möglich war, wurde die Mischung acetyliert, die Acetylderivate ließen sich trennen. Dabei wurden Ranunculin-tetraacetat und eine dazu isomere Verbindung erhalten,

5) *H. Bear, M. Holden* und *B. Seegal*, *J. biol. Chemistry* **162**, 65 (1946).

6) *R. Hill* und *R. van Heyningen*, *Biochem. J.* **49**, 333 (1951).

7) *N. Hellström*, *Kgl. Lantbruks-Högskol. Ann.* **25**, 333 (1959); *C. A.* **54**, 7799 (1960).

8) *B. B. Bredenber*, *Suomen Kemistilehti* **34B**, 80 (1961); *C. A.* **56**, 3435 (1962).

9) *M. H. Benn* und *L. J. Yelland*, *Canad. J. Chem.* **46**, 729 (1968).

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

11) *R. Tschesche, F.-J. Kämmerer* und *G. Wulff*, *Chem. Ber.* **102**, 2057 (1969).

12) *H. W. L. Ruigrok*, *Over de Verspreiding van Ranunculine en cyanogene Verbindingen bij de Ranunculaceae*; Proefschrift aan de Rijksuniversiteit te Leiden 1967; *C. A.* **66**, 453 (1967).

13) *G. Wulff, R. Tschesche, F.-J. Kämmerer, K. Welmar* und *H.-J. Hoppe*, *Dtsch. Apotheker-Ztg.* **110**, 1177 (1970).

Tab. 1. Protonenresonanzen von 4a, 5a, 7a, 7b, 8a (τ -Werte, J in Hz) *)

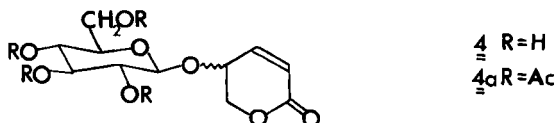
	1'-H	2'-H	3'-H	4'-H	5'-H	6'-H ₂	OCH ₃	2-H _n	3-H _n	4-H	5-H ₂
4a	5.60 (d, 1) $J_{1,2'} = 7$		4.65-5.20 (m, 3)		~6.50 (m, 1)	5.90 (m, 2)	—	4.11 (d, 1) $J_{2,3} = 9.8$ $4J_{2,4} = 0.6$	3.46 (d, 1) $J_{2,3} = 9.8$ $J_{3,4} = 2.2^{**}$	5.7-6.0 (m, 3)	
5a	5.45 (d, 1) $J_{1,2'} = 8.1$	6.14 (t, 1) $J_{1,2'} = 8.1$ $J_{2,3'} = 10.2$	4.67-5.04 (m, 1)	4.86 (m, 1)	5.95 (m, 1)	H _{6'a} = 5.74 H _{6'b} = 5.85 $J_{5',6'a} < 1.0$ $J_{5',6'b} = 1.8$ $J_{6'a,6'b} \sim 12$	—	7.40, 7.84 (m, 4)		—	H _{5a} = 5.90 H _{5b} = 6.13 $J_{5a,5b} = 12.4$
7a	5.41 (d, 1) $J_{1,2'} = 7.7$	4.99 (~t, 1) $J_{2,3'} \sim 9.5$	4.77 (t, 1) $J_{3,4'} \sim 9$	4.93 (t, 1) $J_{4,5'} \sim 8$	6.28 (m, 1)	H _{6'a} ~ 5.79 H _{6'b} ~ 5.84	—	6.6-7.5 (m, 4)		—	H _{5a} = 5.71 H _{5b} = 5.95 $J_{5a,5b} = 16$
7b	5.68 (d, 1) $J_{1,2'} = 7.5$		6.40-6.75 (m, 4)			5.80 (m, 2)	—	6.8-8.0 (m, 4)		—	H _{5a} = 5.75 H _{5b} = 6.19 $J_{5a,5b} = 16.5$
8a	5.40 (d, 1)		4.60-5.15 (m, 3)		6.40 (m, 1)	5.85 (m, 2)	6.41 (s, 3)	7.15-7.75 (m, 4)		—	H _{5a} = 4.16 H _{5b} = 4.73 $J_{5a,5b} = 13$

*) TMS als interner Standard, $\tau = 10$ (Meßtemp. 20°). Gemessen wurde bei 90 MHz in CDCl₃, nur 4a in CDCl₃ + 30% C₆D₆, und 7a bei 220 MHz in CDCl₃.

***) In CDCl₃ ließ sich eine zusätzliche Fernkopplung $4J_{3,5} = 1.1$ Hz zuordnen.

die mit Isoranunculin-tetraacetat (**4a**) bezeichnet wurde. IR- und CD-Spektrum von **4a** offenbarten das Vorliegen eines 2,3-ungesättigten Lactonringes. Die genaue Struktur des Isoranunculins konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und zusätzlicher Entkopplung der Signale abgeleitet werden (vgl. Tab. 1).

Im NMR-Spektrum zeigten sich die typischen Signale eines 2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylrestes mit 4 Acetylgruppen bei τ 7.9–8.1 und dem H an C-1' bei τ 5.60, $J_{1',2'} = 7$ Hz. Im Aglykonanteil traten zwei vinyliche Protonen auf, die ein AB-Spektrum bildeten. Das Signal des Protons an C-2 wurde durch long range-Kopplung mit dem an C-4 noch einmal aufgespalten ($J_{2,4} = 0.6$ Hz) und das an C-3 noch einmal durch die H an C-4 und C-5. Die Signale der Protonen an C-4 und C-5 waren nicht gut differenzierbar und befanden sich im Bereich τ 5.7–6.0. Nach diesen Ergebnissen und der C,H-Analyse mußte Isoranunculin das β -D-Glucosid eines 2,3-ungesättigten δ -Lactons sein. Nicht ganz eindeutig bestimmt war noch die Anknüpfung des Zuckerrestes an C-4 oder C-5 des Lactonringes. Die Entscheidung darüber konnte durch das Kopplungsschema im NMR sowie durch den Vergleich mit dem Spektrum des 3-Methyl-penten-(2)-olids-(5.1)¹⁴ getroffen werden. Die Signale der Protonen der CH₂-Gruppe des Lactonteils liegen bei τ 5.7–6.0, wie für eine CH₂-Gruppe neben Sauerstoff zu erwarten. Bei der Struktur mit einer Zuckeranknüpfung an C-5 sollten die Signale der Protonen der (4)-CH₂-Gruppe bei 7.6 auftreten. Das Kopplungsschema des H an C-3 sollte ebenfalls eine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten zulassen. Beeinflußt wurde diese Überlegung dadurch, daß auch die CH₂-Gruppe an C-5 eine long range-Kopplung mit dem H an C-3 von $^4J_{3,5} = 1.1$ Hz zeigte. Es bestand also theoretisch die Möglichkeit, daß das Signal des H an C-3 bei einer Anknüpfung der Glucose an C-5 durch eine benachbarte CH₂-Gruppe in Position 4 mit $J_{3,4} = 2.2$ Hz und $J_{3,4} = 1.1$ Hz aufgespalten wurde. Nun sind aber zwei derartig kleine Kopplungskonstanten durch eine benachbarte CH₂-Gruppe nicht möglich, man sollte nach Karplus¹⁵ etwa 0 Hz und 6.7 Hz erwarten. Demnach dürfte Isoranunculin die Struktur **4** haben. Das Massenspektrum stützt diese Struktur durch den Peak höchster Intensität, *m/e* 97; er entspricht dem Aglykanteil nach homolytischer Spaltung. Die Konfiguration an C-4 wurde nicht ermittelt.



Da Ranunculin und Isoranunculin nach Alkoholextraktion des Pflanzenmaterials nicht gefunden wurden, muß angenommen werden, daß sie sich erst unter den sauren Extraktionsbedingungen gebildet haben. Eine weitere Aufarbeitung erfolgte daher unter sehr schonenden Bedingungen unter Ausschluß von Alkoholen und Säure.

Blüten von *Helleborus foetidus* wurden nach Gefriertrocknung mit Aceton/Wasser (1 : 1) extrahiert. Der Extrakt enthielt, wie Papier- und Dünnschichtchromatographie zeigten, kein Ranunculin bzw. Isoranunculin; dagegen fanden sich neben Glucose und Fructose zwei andersartige nicht reduzierende Zuckerderivate. Die Auftrennung gelang an einer Cellulosesäule mit dem Laufmittel Essigester/Pyridin/Wasser (3.6 : 1 : 1.15). Beide neuen Verbindungen konnten kristallin erhalten werden. Sie wurden *Ranuncosid* (**5**) und *Ranunculosid* (**7**) benannt und in einer Ausbeute von 1.7 bzw. 1.3 % (bezogen auf Trockengewicht) erhalten.

¹⁴) R. Tschesche, K. Struckmeyer und G. Wulff, Chem. Ber. **104**, 3567, 1971.

¹⁵) D. H. Williams und J. Fleming, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, S. 107, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1968.

Ranuncosid

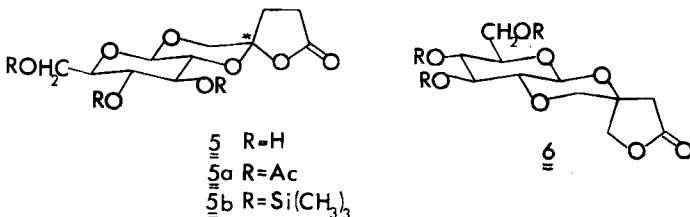
Ranuncosid (**5**) erwies sich als eine recht stabile Verbindung, erst längeres Kochen mit $2n$ HCl spaltete es in einen nicht identifizierten Aglykonanteil und D-Glucose, die chromatographisch nachgewiesen wurde. Das IR-Spektrum ergab Anhaltspunkte für ein gesättigtes γ -Lacton (1770/cm), das NMR-Spektrum zeigte keine vinyllischen Protonen und auch das typische Erscheinungsbild für β -D-Glucoside fehlte.

Bei der Acetylierung erhielt man, abgeleitet aus der NMR-Messung, ein Triacetat **5a**. Das Massenspektrum mit Hochoauflösung lieferte ein Molekular-Ion m/e 402.1159 entsprechend einer Summenformel $C_{17}H_{22}O_{11}$, die intensivsten Peaks lagen bei m/e 97 ($C_5H_5O_2$) und 98 ($C_5H_6O_2$) und sollten dem abgespalteten Aglykanteil zukommen.

Die Strukturaufklärung wurde wiederum mit Hilfe der NMR-Spektroskopie erreicht. Die Signale der Protonen des Zuckeranteils von **5a** lagen etwas ungewöhnlich, so daß jedes Proton durch Entkopplung und Indor-Technik einzeln zugeordnet werden mußte. Das Signal des Protons an C-1' zeigte nach Lage und Kopplungskonstante ($J = 8.1$ Hz) eine β -glucosidische Verknüpfung an. Die Signale der Protonen an C-3', C-4' und C-6' wiesen durch ihre Lage auf eine benachbarte Acetoxy-Gruppe hin, das Signal des Protons an C-2' dagegen fand sich bei τ 6.14, was auf eine benachbarte O-Alkyl-Gruppe schließen läßt. Der Zuckerteil von **5** sollte daher über die OH-Gruppen von C-1 und C-2 Bindungen eingegangen sein.

Der Aglykanteil wies lediglich 3 CH_2 -Gruppen auf, von denen eine (τ 6.01) ein nicht weiter aufgespaltenes AB-Spektrum mit $J_{AB} = 12.4$ Hz zeigte. Diese Gruppe ist nach Lage des Signals mit einem Sauerstoff direkt verknüpft. Die beiden anderen CH_2 -Gruppen finden sich bei τ 7.40 und 7.84 als Multipletts und koppeln nur untereinander, wie durch Indor-Technik ermittelt werden konnte. Sie müssen daher direkt benachbart sein. Der Vergleich der NMR-Spektren von Ranuncosid mit entsprechenden, am Pyranring unsubstituierten Dioxin-Verbindungen¹⁶⁾ ergab eine große Ähnlichkeit.

Aufgrund dieser Befunde bleiben für das Ranuncosid nur die Strukturen **5** und **6** übrig. **6** erscheint deswegen unwahrscheinlich, weil hier in der 2'-Stellung des Zuckers eine Ätherbindung vorläge, die bei saurer Hydrolyse schwer spaltbar sein sollte. Um auszuschließen, daß erst bei der Acetylierung der Ringschluß zum OH an C-2' eingetreten ist, wurde Ranuncosid silyliert; dabei wurden nach Aussage des NMR-Spektrums 3 Silylgruppen eingeführt. Ranuncosid besitzt daher die Struktur **5**. Eine ähnliche Verbindung, jedoch ohne Lactonringteil, ist bereits von *Helferich* und *Werner*¹⁷⁾ beschrieben worden.



* Stereochemie am C-4 unbekannt

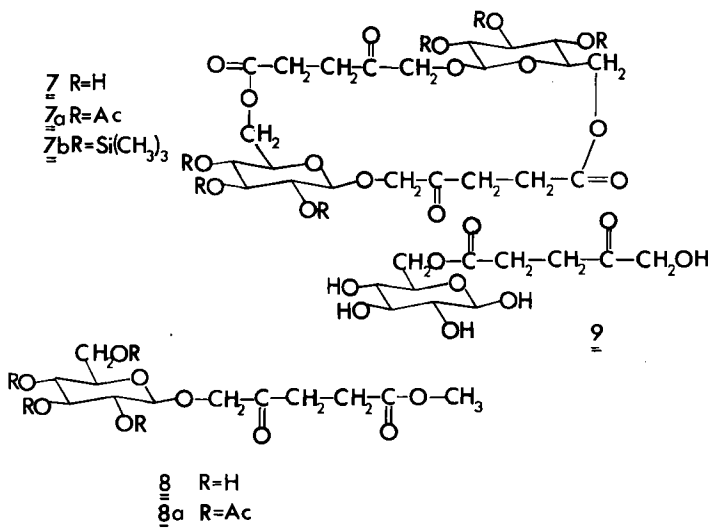
16) *F. Sweet* und *R. K. Brown*, *Canad. J. Chem.* **45**, 1007 (1967).

17) *B. Helferich* und *J. Werner*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **75**, 949 (1942).

Ranunculosid

Auch die Verbindung **7** erwies sich als recht stabil. Bei saurer Hydrolyse wurde Glucose abgespalten. IR- und CD-Spektren wiesen auf das Vorliegen eines gesättigten Esters und eines Ketons hin.

Das Massenspektrum der peracetylierten Verbindung **7a** lieferte ein Molekular-Ion von *m/e* 804, das einem Dimeren des Ranuncosid-acetats **5a** entsprechen würde. Das NMR-Spektrum (vgl. Tab. 1) zeigte im Zuckerteil Signale entsprechend einem 2'.3'.4'.6'-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosyl-Rest. Im Aglykonanteil fanden sich 3 verschiedene Signalgruppen, die jeweils 4 Protonen entsprachen. Zwei offenbar identische CH_2 -Gruppen gaben Anlaß zu einem AB-Spektrum bei τ 5.80 mit $J_{AB} = 16$ Hz ohne weitere Kopplung. Zwischen τ 6.6 und 7.5 beobachtete man 8 weitere Protonen des Aglykonteils, die ein Multiplett bildeten. Bemerkenswerterweise fanden sich nur 6 Acetylgruppen, obwohl im Zuckerrest offenbar 8 Positionen einen *O*-Acylrest tragen. Um zu entscheiden, welche Position schon im nicht-acetylierten Ranuncosid eine *O*-Acylgruppe trägt, wurde **7** silyliert und durch NMR-Spektroskopie untersucht. Die Signale aller Protonen, die jetzt einer *O*-Silyl-Gruppe benachbart waren, fanden sich um 1.5 ppm nach höherem Feld verschoben. Lediglich die Signale der 4 Protonen der C-6'-Gruppen blieben in fast unveränderter Lage bei τ 5.80. Demnach trägt offenbar jeder Zuckerrest an C-1' eine Alkoxy- und an C-6' eine Acyloxy-Gruppe. Über diese Gruppen muß daher die Verknüpfung der beiden Zuckerreste miteinander und dem Aglykon erfolgen.



Aufgrund dieser Befunde und unter der Annahme einer möglichen Verwandtschaft mit Ranuncosid könnte die Struktur **7** für Ranuncosid in Frage kommen. Eine Aufspaltung des angenommenen Ringsystems gelang durch Methanolyse nach *Zemplén* und *Pacsu*¹⁸⁾. Es wurde so der Methylester der 5-Hydroxy-4-oxo-n-valeriansäure erhalten, der am 5-Hydroxyl β -glykosidisch D-Glucose gebunden enthielt. Acetylierung lieferte ein Tetraacetat. Das NMR-Spektrum (vgl. Tab. 1) stand mit der angenommenen Struktur **8a** in Übereinstimmung. Auch das Massenspektrum lieferte den er-

¹⁸⁾ G. *Zemplén* und E. *Pacsu*, Ber. dtsh. chem. Ges. **62**, 1613 (1929).

warteten Molekularpeak m/e 476 sowie ein sehr intensives Fragment m/e 130, das dem Aglykon $(C_6H_9O_3)H^+$ zugeordnet werden mußte. Beim Versuch, mit einer β -Glucosidase die Glykosidbindung von **7** zu öffnen und so den monomeren 6-Ester **9** zu erhalten, konnte laut chromatographischer Kontrolle eine quantitative Umsetzung festgestellt werden. Es entstand eine Verbindung, die sich chromatographisch von Glucose deutlich unterschied, die jedoch bei der Säulenchromatographie an Kieselgel Glucose abspaltete und nicht rein isoliert werden konnte. Dieses Verhalten wäre für eine Substanz der Struktur **9** nicht überraschend. Damit kommt nur die Struktur **7** für das Ranunculosid in Frage. Sehr bemerkenswert ist das Vorliegen eines 22-gliedrigen Ringes in dieser Verbindung.

Auch Ranuncosid und Ranunculosid können aufgrund ihrer Eigenschaften wohl nicht genuine Inhaltsstoffe von Pflanzen der Familie *Ranunculaceae* sein. In einer weiteren Arbeit werden wir über die chemischen Zusammenhänge dieser durch verschiedene Extraktionsmethoden gewonnenen Verbindungen, ihre pflanzenphysiologische Bedeutung und über die Natur des genuine Vorläufers selbst berichten.

Isoranunculin, Ranuncosid und Ranunculosid zeigen gegen *Bacillus subtilis* und *Pythium debaryanum* keine antibiotische Aktivität.

Herrn Prof. Dr. F. Schönbeck, Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Bonn, danken wir für die mikrobiologischen Untersuchungen, Herrn Dr. H.-W. Fehlhaber für die Anfertigung und Interpretation der Massenspektren und Frl. L. Winterfeld für die Durchführung der NMR-spektroskopischen Entkopplungs- und Indor-Messungen. Dem Institut für makromolekulare Chemie in Freiburg (Frau Dr. G. Keilich) sind wir für die Aufnahme des 220 MHz-NMR-Spektrums sehr zu Dank verpflichtet. Dem Landesamt für Forschung beim Minister für Wissenschaft und Forschung 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.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden nach Kofler in der Anordnung nach Weygand (Mikroskop-Heiztisch) bestimmt. Die IR-Spektren sind mit dem Perkin-Elmer Modell 221, die Kernresonanzspektren mit den Apparaten Varian A 60 und Spektrospin (90 MHz), sowie die Massenspektren mit den Geräten MS 9 der A. E. I und dem CH-4 der Atlas-M. A. T. gemessen worden. Die optischen Drehwerte wurden mit dem Polarimeter 141 von Perkin-Elmer, und die CD-Spektren mit dem Dichrograph II von Roussel-Jouan bestimmt. Die C,H-Analysen wurden vom Mikroanalytischen Laboratorium der Fa. Dr. F. Pascher, Bonn, ausgeführt. Zur Säulenchromatographie (SC) benutzte man Kieselgel der Fa. Gebr. Herrmann, Köln, und Munktell's Cellulosepulver Nr. 400.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) führte man in der bei Tschesche, Freytag und Snatzke¹⁹⁾ beschriebenen Form aus (Kieselgel G für DC von E. Merck). Als Lösungsmittelsysteme dienten:

System A: $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (65 : 35 : 10)²⁰⁾ (untere Phase)

System B: $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (65 : 25 : 10) (untere Phase)

System C: Benzol/Aceton (8 : 1)

¹⁹⁾ R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

²⁰⁾ T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **11**, 1546 (1963).

Nach dem Trocknen wurde mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1 : 2) angesprüht und durch Erhitzen (150°, 5 Min.) eine Anfärbung der Substanzen erreicht.

Zur Papierchromatographie (PC) diente das Papier von Schleicher & Schüll Nr. 2043 b. Die Chromatogramme wurden absteigend entwickelt. Als Lösungsmittel verwendete man: System D: Essigester/Pyridin/Wasser (3.6 : 1 : 1.15) (obere Phase)²¹⁾, Dauer 14–18 Stdn. im Durchlaufverfahren.

Die Chromatogramme wurden mit Anilinphthalat nach *Partridge*²²⁾ oder mit Silbernitrat nach *Dedonder*²³⁾ angefärbt.

Tab. 2. R_F -Werte in der Dünnschichtchromatographie

	R_F -Wert im System C		R_F -Wert im System A
Methyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucosid	0.63	D-Glucose	0.23
Isopropyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucosid	0.65	L-Rhamnose	0.42
		D-Fructose	0.25
Pentaacetylglucose	0.60	Methyl- β -D-glucopyranosid	0.50
4a	0.30	Isopropyl- β -D-glucopyranosid	0.55
5a	0.32	5	0.63
7a	0.25	7	0.38
		4	0.42
		1	0.42

Aufarbeitung mit Alkoholen

12 kg frische Stengel, Blätter und Blüten von *Ranunculus repens* zerkleinerte man mit dem Ultraturrax in 10 l 80proz. *Isopropylalkohol*. Nach Filtration und zweimaliger weiterer Extraktion engte man bis zur Entfernung des Isopropylalkohols ein und extrahierte zur Entfernung von Farbstoffen zweimal mit Chloroform. Nach Einengen der wäbr. Lösung i. Vak. wurden 308 g eines braunen Sirups erhalten. Hiervon trennte man 10 g durch SC an 1 kg Kieselgel mit dem Lösungsmittelsystem B auf und erhielt 2.03 g kristallines *Isopropyl- β -D-glucopyranosid* (Ausb. 0.5%). Zur besseren Identifizierung wurde in Pyridin/*Acetanhydrid* 2 : 1 bei Raumtemp. acetyliert.

Eine entsprechende Aufarbeitung mit 80proz. *Methanol* lieferte das *Methyl- β -D-glucopyranosid*, das ebenfalls acetyliert wurde. Die gleichen Verbindungen wurden chromatographisch bei der Aufarbeitung von *Helleborus foetidus* nachgewiesen.

Isopropyl-2.3.4.6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid: Schmp. 136–137° (aus Äthanol/Wasser); $[\alpha]_D^{20}$: -30° ($c = 0.9$; CHCl_3). Die Verbindung war identisch mit authent. Material²⁴⁾.

Methyl-2.3.4.6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid: Schmp. 102–103° (aus Äthanol/Wasser), $[\alpha]_D^{20}$: -22.4° ($c = 1.0$, CHCl_3). Die Substanz war identisch mit authent. Material²⁵⁾.

²¹⁾ P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirota, G. Ruffini und A. Sartori, J. Chromatogr. [Amsterdam] **3**, 343 (1960).

²²⁾ S. M. Partridge, Nature [London] **164**, 443 (1949).

²³⁾ R. Dedonder, Bull. Soc. chim. France **1952**, 874.

²⁴⁾ S. Veibel und F. Eriksen, Bull. Soc. chim. France **1936**, 277.

²⁵⁾ C. S. Hudson und J. K. Dale, J. Amer. chem. Soc. **37**, 1264 (1915).

*Aufarbeitung nach Hill und van Heyningen*⁶⁾

1 kg frische Blüten von *Helleborus foetidus* wurden mit einem Ultraturax in einer Mischung von 1100 ccm Wasser und 33 ccm konz. Salzsäure zerkleinert. Nach 2 Stdn. Stehen lassen zentrifugierte man von festen Bestandteilen ab, versetzte die Lösung mit 36 g Aktivkohle und ließ 20 Min. bei Raumtemp. stehen. Nach der Filtration wurden zur Adsorption des Ranunculins nochmals 122 g Aktivkohle zugefügt. Man ließ unter gelegentlichem Umrühren 60 Min. stehen, filtrierte die Aktivkohle ab und wusch sie gründlich mit dest. Wasser, bis Säure nicht mehr nachweisbar war. Danach eluierte man die Kohle mit insgesamt 2 l Äthanol/Wasser (1:1) und engte das Eluat i. Vak. ein (8 g).

Durch DC (System A und B) und PC (System D) erhielt man neben Glucose eine Hauptsubstanz mit dem gleichen R_F -Wert wie Ranunculin. Eine direkte Kristallisation entsprechend der Vorschrift von Hill und van Heyningen zur Gewinnung von Ranunculin gelang nicht.

Ähnliche Ergebnisse erbrachte die entsprechende Extraktion von *Ranunculus repens* (Blüten, Blätter und Stengel), bei der 5 g Rohsirup erhalten wurden. Säulenchromatographie des Extraktes aus *Helleborus foetidus* (8 g) an 800 g Kieselgel mit dem System B ergab 712 mg einer Fraktion, die chromatographisch dem Ranunculin entsprach. Aus dem Extrakt aus *Ranunculus repens* (5 g) erhielt man 363 mg einer entsprechenden Fraktion.

Beide Fraktionen enthielten gemäß dem NMR-Spektrum eine Mischung von Ranunculin (1) und Isoranunculin (4) im Verhältnis 2:1.

NMR (D₂O): Vom Ranunculin: τ_2 3.57, $J_{2,3} = 6$ Hz, $J_{2,4} = 1.7$ Hz, τ_3 2.10, $J_{3,4} = 1.5$ Hz; vom Isoranunculin: $\tau_2 = 3.65$, $J_{2,3} = 10$ Hz, τ_3 2.66, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, $J_{3,5} = 1.1$ Hz.

Zur Trennung der beiden Substanzen acetylierte man in üblicher Weise 244 mg der Mischung von 1 und 4. Das Rohprodukt (379 mg) wurde durch Säulenchromatographie an 40 g Kieselgel mit dem System C aufgetrennt. Man erhielt neben Ranunculin-tetraacetat 130 mg 4a.

Isoranunculin-tetraacetat (4a): Schmp. 145–146° (Nadeln aus Äthanol/Wasser). $[\alpha]_D^{20}$: –64.7° ($c = 0.90$; CHCl₃).

IR (CHCl₃): 1740 (Lacton), 1755/cm (Acetat).

CD: 214 nm, $\Delta\epsilon = -6.57$; 252 nm, $\Delta\epsilon = +0.389$ (Methanol).

NMR: vgl. Tab. 1.

MS: m/e 384 (2.9%, M – AcOH), 371 (0.6%, M – CH₂OAc), 324 (1.5%, M – 2 AcOH), 222 (5.3%, M – 2 AcOH – Ac₂O), 98 (52.9%, M – C₁₄H₁₈O₁₀), 97 (100%, M – C₁₄H₁₉O₁₀).

C₁₉H₂₄O₁₂ (444.4) Ber. C 51.35 H 5.44 Gef. C 51.20 H 5.49

Enzymatische Spaltung von 1 und 4: Ein Gemisch von 1 und 4 (5 mg) in 5 ccm Wasser wurde 12 Stdn. mit 5 mg β -Glucosidase (Emulsin) stehengelassen. Danach war mit DC und PC kein Ausgangsmaterial mehr nachweisbar. Als Zucker konnte nur *D*-Glucose nachgewiesen werden.

Aufarbeitung unter schonenden Bedingungen mit Aceton/Wasser

315 g frische Blüten von *Helleborus foetidus* wurden gefriergetrocknet (~63 g). Anschließend extrahierte man 3 mal mit 500 ccm Aceton/Wasser (1:1), dann wurde das Aceton bei Raumtemp. i. Vak. entfernt und die wäßr. Lösung durch Gefrier Trocknung eingeengt (~10 g). DC (System A und B) und PC (System D) zeigten im Rückstand hauptsächlich zwei Substanzen an, die nicht mit Glucose oder Ranunculin identisch waren. Ranunculin selbst war nicht nachweisbar.

Zur säulenchromatographischen Trennung wurden 10 g Extrakt, aufgezogen auf 15 g Cellulose, an 600 g Cellulose mit dem System D chromatographisch aufgetrennt. Man erhielt chromatographisch einheitlich 1.05 g **5** und 0.8 g **7**.

Ranuncosid (5): Schmp. 206–208° (Nadeln aus Äthanol/Wasser), $[\alpha]_D^{20}$: +40.2° ($c = 0.5$, Äthanol/Wasser).

IR (KBr): 1770/cm (Lacton). — CD: 214 nm, $\Delta\epsilon = +0.73$ (Äthanol).

$C_{11}H_{16}O_8 \cdot H_2O$ (294.3) Ber. C 44.90 H 6.17 Gef. C 45.17 H 6.16

Ranunculosid (7): Schmp. 153–154° (Blättchen aus Methanol/Wasser), $[\alpha]_D^{20}$: –4° ($c = 1$, Methanol).

IR (KBr): 1730/cm (C=O). — CD: 214 nm, $\Delta\epsilon = -0.37$; 283 nm, $\Delta\epsilon = +0.22$.

$C_{22}H_{32}O_{16} \cdot 2 H_2O$ (588.4) Ber. C 44.90 H 6.16 Gef. C 44.91 H 6.33

Reaktionen von Ranuncosid (5)

Triacetyl-ranuncosid (5a): 100 mg **5** wurden in üblicher Weise in Pyridin/Acetanhydrid (2 : 1) bei Raumtemp. acetyliert (120 mg). Schmp. 175–176° (Nadeln aus Äthanol/Wasser), $[\alpha]_D^{20}$: +30° ($c = 1.00$, $CHCl_3$).

IR ($CHCl_3$): 1788 (Lacton), 1753/cm (Acetat). — NMR: vgl. Tab. 1.

MS: m/e 402 (1.6%, M^+), 358 (6.8%), 282 (30%, $M - 2 AcOH$), 240 (30%, $M - 2 AcOH - CH_2CO$), 227 (24.4%), 157 (31%), 156 (32%), 143 (30%), 139 (44%), 115 (60%), 110 (68%), 98 (84%), 97 (100%, $C_3H_5O_2$, Aglykon). Die genaue Zusammensetzung der in der Struktur angegebenen Ionen wurde durch hochauflösende Massenspektroskopie ermittelt.

$C_{17}H_{22}O_{11}$ (402.3) Ber. C 50.74 H 5.51 Gef. C 50.35 H 5.76

Hydrolyseversuche

a) *Enzymatisch*: 70 mg **5** wurden mit 70 mg *Emulsin* in 10 ccm Wasser 12 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Die DC (System B) zeigte keine Umsetzung.

b) *Sauer*: 5 mg **5** wurden mit 3 ccm 2*n* HCl 2 Stdn. auf 80° erhitzt. Durch DC und PC wurde *Glucose* als Spaltprodukt nachgewiesen. Der Aglykanteil wurde nicht weiter untersucht.

Quantitative Bestimmung der freien OH-Gruppen in 5: 100 mg **5** in 5 ccm Pyridin wurden mit 0.2 ccm *Trimethylchlorosilan* und 0.2 ccm *Hexamethyldisilazan* unter Feuchtigkeitsausschluß über Nacht stehengelassen. Nach dreimaligem Abdampfen mit 10 ccm Benzol löste man in Benzol, filtrierte von NH_4Cl ab und engte ein²⁶⁾ (179 mg **5b**). Das Umsetzungsprodukt **5b** wurde direkt ohne TMS-Zusatz im NMR vermessen, wobei die Integration des Silyl-äther-Peaks bei τ 9.8–9.9 drei Silylgruppen anzeigte. Da die Silylierung innerhalb weniger Min. quantitativ verläuft²⁷⁾, ist eine Wasserabspaltung unter Ketalisierung unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich.

Reaktionen von Ranunculosid (7)

Hexa-O-acetyl-ranunculosid (7a): 100 mg **7** wurden wie beschrieben acetyliert (125 mg). Schmp. 233–234° (Nadeln aus Methanol/Wasser); $[\alpha]_D^{20}$: –3.0° ($c = 0.94$; $CHCl_3$).

IR ($CHCl_3$): 1760/cm (Ester und Acetat): NMR: vgl. Tab. 1.

MS: m/e 804 (0.2%, M^+), 745 (1%, $M - OAc$), 684 (4.8%, $M - OAc - AcOH$), 642 (2.6%, $M - OAc - AcOH - CH_2CO$), 584 (2%), 431 (26%), 386 (13%), 345 (10.8%),

²⁶⁾ G. Wulff, J. Chromatogr. [Amsterdam] **18**, 285 (1963).

²⁷⁾ C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita und W. W. Wells, J. Amer. chem. Soc. **85**, 1205 (1963).

331 (2.8%), 269 (20.8%), 224 (23.6%), 169 (40%), 143 (100%). Die genaue Zusammensetzung der in der Struktur angegebenen Ionen wurde durch hochauflösende Massenspektroskopie ermittelt.

$C_{34}H_{44}O_{22}$ (804.6) Ber. C 50.80 H 5.51 Gef. C 50.10 H 5.45

Massenspektroskopisch: Ber. für $C_{34}H_{44}O_{22}$ 804.2324 Gef. 804.2318

Silylierung von 7: 96 mg wurden, wie bei **5** beschrieben, silyliert und **7b** im NMR vermessen, vgl. Tab. 1.

*Hydrolyse von 7 nach Zemlén*¹⁸⁾: 41 mg **7** löste man in 4 ccm *absol. Methanol* und ließ mit 2 ccm 0.1 n *Natriummethylat*-Lösung in *Methanol* 12 Stdn. bei Raumtemp. unter Feuchtigkeitsausschluß stehen. Die Lösung wurde direkt über eine Säule mit 10 g Kieselgel filtriert, wodurch Alkali und eine gelbe Verunreinigung entfernt wurden. Man erhielt 44 mg **8** als farbloses Öl.

4-Oxo-5-[2'.3'.4'.6'-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy]-pentansäure-methylester (8a): Zur besseren Charakterisierung von **8** wurden die erhaltenen 44 mg wie üblich acetyliert. Schmp. 94° (Nadeln aus Äthanol/Wasser), $[\alpha]_D^{20}$: -23° ($c = 1.0$, $CHCl_3$).

IR ($CHCl_3$): 1755/cm (Ester, Acetat). NMR: vgl. Tab. 1. CD: 212 nm, $\Delta\epsilon = -1.15$, 285 nm, $\Delta\epsilon = -0.05$ (Äthanol).

MS: *m/e* 476 (0.4%, M^+), 446 (0.8%), 416 (2.8%), 356 (12%, $M - 2$ AcOH), 347 (4%), 331 (23%), 283 (12%, $C_{13}H_{15}O_7$), 169 (49.6%), 130 (33%, $C_6H_{10}O_3$), 115 (100%). Die Elementarzusammensetzung der angegebenen Peaks wurde durch hochauflösende Massenspektroskopie ermittelt.

$C_{20}H_{28}O_{13}$ (476.1) Ber. C 50.46 H 5.94 Gef. C 50.11 H 5.86

Hydrolyse von 7 mit Emulsin: 72 mg **7** löste man in 5 ccm Wasser und ließ mit 200 mg *Emulsin* 12 Stdn. bei Raumtemp. stehen. Es wurde durch DC und PC eine Substanz (**9**) nachgewiesen, die sich von Glucose unterschied. Bei ihrer Isolierung durch SC an Kieselgel zersetzte sie sich. Es war nur noch Glucose nachweisbar. Verbindung **9** konnte daher noch nicht isoliert werden.

[373/71]