

54. Frugosid, ein zweites kristallisiertes Glykosid aus den Samen von *Gomphocarpus fruticosus* (L.) R. Br.

Glykoside und Aglykone, 91. Mitteilung¹⁾

von A. Hunger und T. Reichstein.

(28. XII. 51.)

Vor kurzem ist die Isolierung des Gofrusids, eines herzaktiven Glykosids, aus den Samen von *Gomphocarpus fruticosus* (L.) R. Br. (Asclepiadaceae), beschrieben worden²⁾. Durch die Bemühungen von Pater J. Gerstner (†) erhielten wir inzwischen nochmals eine grössere Menge solcher Samen und konnten feststellen, dass sie nach Fermentierung ausser dem genannten noch ein zweites Glykosid (dieses sogar in etwas grösserer Menge) enthalten, das in Kristallen isoliert wurde und das wir Frugosid nennen. Dieses konnte jetzt auch aus einigen amorphen Extrakten der früher²⁾ untersuchten Samencharge erhalten werden. Nach Vorliegen der Impfkristalle von Frugosid war hingegen die Reinigung des Gofrusids erschwert. Die beiden Glykoside lassen sich durch Kristallisation und Chromatographie an Al_2O_3 nur schwer trennen. Besser gelang dies durch Gegenstromverteilung zwischen Wasser und einem Gemisch von Chloroform-Äther (7:3)³⁾, wobei das Gofrusid vorwiegend in die organische Phase überging, während das Frugosid aus der wässrigen Lösung mit reinem Chloroform oder besser mit Chloroform-Alkohol-Gemischen ausgeschüttelt wurde. Aus den so erhaltenen Konzentraten liessen sich die zwei Glykoside nach chromatographischer Vorreinigung durch fraktionierte Kristallisation rein erhalten. Wie wir inzwischen fanden, besitzt Gofrusid eine Aldehydgruppe⁴⁾, während eine solche beim Frugosid fehlt. Eine Trennung mit Reagens T von Girard & Sandulesco⁵⁾, wie sie bei Strophanthidin-Glykosiden gelingt⁶⁾, war aber hier nicht möglich, da Gofrusid sich mit Reagens T nicht umsetzte.

Frugosid erwies sich als methoxylfrei und gab bei der Analyse Werte, die auf die Formel $C_{29}H_{44}O_9$ passten. Die alkoholische Lösung zeigte im Ultravioletten die in Fig. 1 angegebene Absorption. Dieselbe Bruttoformel wurde früher auch für Gofrusid als am wahrscheinlichsten angegeben. Neuere Resultate zeigten aber, dass Gofrusid die Formel $C_{29}H_{42}O_9$ besitzt⁴⁾, also zwei H-Atome weniger enthält als

¹⁾ 90. Mitteilung: K. Reyle & T. Reichstein, Helv. **35**, 195 (1952).

²⁾ M. Keller & T. Reichstein, Helv. **32**, 1607 (1949).

³⁾ Verhältnis der Volumteile. Dies gilt für alle folgenden Verhältniszahlen.

⁴⁾ A. Hunger & T. Reichstein, Helv. **35** (1952), spätere Mitteilung.

⁵⁾ A. Girard & G. Sandulesco, Helv. **19**, 1095 (1936).

⁶⁾ O. Schindler & T. Reichstein, Helv. **34**, 521 (1951).

Frugosid. Die Acetylierung von Frugosid gab ein Acetat, das bisher nicht kristallisierte; hingegen konnte durch Benzoylierung ein krist. Tetrabenzoat $C_{57}H_{60}O_{13}$ erhalten werden, das von CrO_3 in Eisessig bei 20° nach 4 Std. nicht merklich angegriffen wurde und somit keine freie sekundäre HO-Gruppe und keine Aldehydgruppe enthalten dürfte.

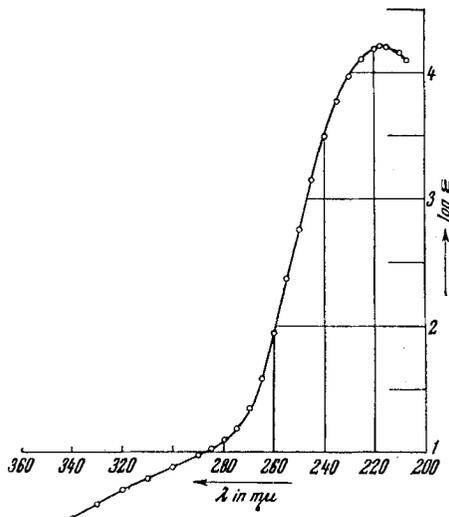


Fig. 1.

Ultraviolett-Absorptionsspektrum von Frugosid in Alkohol¹⁾. Maximum bei $217\text{ m}\mu$ und $\log \epsilon = 4,21$ berechnet für $C_{25}H_{44}O_9$ (536,64). Das Präparat wurde vorher 2 Std. bei 100° und 0,02 Torr getrocknet.

Herr Dr. *Chen* hatte die Freundlichkeit, Frugosid an der Katze zu prüfen²⁾. Als geometrisches Mittel der letalen Dosis fand er an 10 Tieren $0,1611 \pm 0,014\text{ mg/kg}$. Es handelt sich somit um ein relativ stark herzwirksames Glykosid, das ebenso oder noch etwas wirksamer ist als Gofrusid³⁾.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Untersuchung durch Mittel aus den *Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes* sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

Experimenteller Teil.

Alle Schmelzpunkte sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert, Fehlergrenze bis 200° etwa $\pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Drehung wurden 1 Std. bei 0,01 Torr und 70° getrocknet, zur Analyse 3 Std. bei 0,01 Torr und 100° über P_2O_5 mit Einwaage im Schweinchen. Ausführung der *Legal*-Reaktion⁴⁾, der *Keller-Kiliani*-

¹⁾ Aufgenommen von Herrn *P. Zoller* mit einem *Beckman*-Quarz-Spektrophotometer Modell *DU*.

²⁾ Wir danken Herrn Dr. *K. K. Chen*, Indianapolis, auch hier bestens für die Überlassung seiner Resultate.

³⁾ Für Gofrusid fand Herr Dr. *Chen* unter gleichen Bedingungen $0,1905 \pm 0,196\text{ mg/kg}$.

⁴⁾ *W. A. Jacobs & A. Hoffmann*, *J. Biol. Chem.* **67**, 333 (1926); *K. Reyle & R. Reichstein*, *Helv.* **35**, 98 (1952).

Reaktion¹⁾ nach früheren Angaben. Zur Chromatographie wurde Al_2O_3 verwendet, das ohne Anwendung von Säure von Alkali befreit²⁾ und bei 190° reaktiviert wurde. Die Chromatographien wurden nach der Durchlaufmethode³⁾ durchgeführt.

Isolierung von Frugosid aus der früher untersuchten Samencharge⁴⁾. 2,8 g noch etwas lösungsmittelhaltiger Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt⁴⁾ (aus 850 g Samen) wurden bei 14 Torr gut getrocknet und der Rückstand (1,6 g) an 50 g Al_2O_3 chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol-Gemischen von 5–20% Methanolgehalt eluierten Anteile (1,005 g) gaben aus Methanol-Äther 680 mg Frugosid in farblosen Nadeln vom Doppel-Smp. $158\text{--}165^\circ/234\text{--}239^\circ$. Farbreaktion mit konz. H_2SO_4 : blassgelb (0'), orange (45'), orange-braun (2 Std.), lila (4 Std.).

Aufarbeitung der neuen Samen. 1,48 kg Samen wurden, wie früher beschrieben⁴⁾, mit Petroläther entfettet (148 g Öl), fermentiert, mehrmals mit verd. Alkohol extrahiert und die vereinigten Extrakte mit $\text{Pb}(\text{OH})_2$ gereinigt. Die auf 500 cm^3 eingeeengte Lösung wurde hierauf einmal mit 1,2 Litern und dreimal mit je 500 cm^3 Äther ausgeschüttelt. Die Ätherauszüge wurden der Reihe nach je zweimal mit 50 cm^3 Wasser, 50 cm^3 2-n. Soda-lösung, 50 cm^3 Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Erhalten wurden 19 g Ätherextrakt als zähes, nicht bitter schmeckendes Öl, das auch nach Chromatographie an Al_2O_3 keine Kristalle gab.

Die wässrige Phase und die ersten zwei Waschwässer wurden vereinigt, im Vakuum wieder auf 500 cm^3 eingeeengt, einmal mit 750 cm^3 und fünfmal mit je 500 cm^3 Chloroform-Äther-(7:3)⁵⁾ ausgeschüttelt und der Reihe nach mit 30 cm^3 Wasser, 30 cm^3 2-n. Soda-lösung und 30 cm^3 Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Erhalten wurden 10,2 g Chloroform-Äther-(7:3)-Extrakt als blassgelber, stark bitter schmeckender Schaum.

Die wässrige Phase wurde hierauf sechsmal mit je 500 cm^3 alkoholfreiem Chloroform und anschliessend noch sechsmal mit je 500 cm^3 Chloroform-Alkohol-(2:1) ausgeschüttelt und die Auszüge der Reihe nach mit dem zum Waschen des Chloroform-Äther-Extrakts verwendeten Waschlösungen gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Erhalten wurden 0,82 g Chloroformextrakt als hellgelber, stark bitter schmeckender Schaum sowie 5,7 g Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extrakt, der ebenfalls stark bitter schmeckte.

Trennung des Chloroform-Äther-(7:3)-Extrakts. Die 10,2 g Material wurden an 300 g Al_2O_3 nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 800 cm^3 der in folgender Tab. genannten Lösungsmittel:

Fraktionsnummer	Lösungsmittel	Eindampfrückstand	
		Menge in g	Habitus, bzw. Smp. der Rohkristalle ⁶⁾
1–3	Chloroform	5,47	amorph
4–9	Chloroform-Methanol (98:2) bis (9:1)	3,35	amorph
10–11	Chloroform-Methanol (9:1) bis (4:1)	0,66	230–255 ^o
12–18	Chloroform-Methanol (4:1) bis (1:1)	0,99	150 ^o /250 ^o

Aus den Fraktionen 1–9 konnten bisher keine Kristalle erhalten werden.

Die Fraktionen 10–11 gaben aus Methanol-Äther 391 mg Kristallgemisch vom Smp. 230–255^o (Trennung siehe unten).

¹⁾ *J. v. Euw & T. Reichstein, Helv. 31, 883 (1948).*

²⁾ Bereitet nach *J. v. Euw, A. Lardon & T. Reichstein, Helv. 27, 1292 (1944), Anm. 2.*

³⁾ *T. Reichstein & C. W. Shoppee, Discussions of the Faraday Soc. 1949, Nr. 7, 305.*

⁴⁾ *M. Keller & T. Reichstein, Helv. 32, 1607 (1949).*

⁵⁾ Es wurde alkoholfreies Chloroform verwendet.

⁶⁾ Nach einmaligem Kristallisieren aus Methanol-Äther.

Die Fraktionen 12—18 gaben aus Methanol-Äther 505 mg Kristallgemisch, das bei 150° teilweise und nach Umwandlung bei ca. 250° definitiv schmolz (Trennung siehe unten).

Die 391 mg Kristallgemisch aus den Fraktionen 10—11 wurden in ca. 30 cm³ 50-proz. Methanol heiss gelöst und das Methanol durch rasches Abkochen entfernt. Die ausfallenden Kristalle wurden heiss abgenutscht¹⁾, mit etwas heissem Wasser gewaschen und anschliessend aus Methanol-Äther umkristallisiert. Sie gaben 224 mg reines Gofrusid, Smp. 248—258° (Färbung mit konz. H₂SO₄ ohne Violetstich nach 4 Std.).

Die 167 mg Mutterlauge obiger Kristalle wurden mit den 505 mg Kristallen aus den Fraktionen 12—18 vereinigt und das Ganze (672 mg) wie oben aus Methanol-Wasser heiss kristallisiert. Die abgeschiedenen Kristalle (523 mg) vom Smp. 209—248° wurden nochmals aus Methanol-Wasser durch Abkochen heiss umkristallisiert und gaben dann aus Methanol-Äther 347 mg fast reines Gofrusid vom Smp. 224—245° (Farbreaktion mit H₂SO₄ wie oben, ohne Violetstich nach 4 Std.).

Die erste Wasser-Mutterlauge gab nach Stehen bei 20° 140 mg rohes Frugosid in Nadeln vom Smp. 148—164°. Dieses lieferte aus Methanol-Äther 113 mg reines Frugosid in Nadeln mit Doppel-Smp. 160/245° (H₂SO₄-Färbung: lila nach 2 Std.).

Alle nunmehr verbliebenen Kristallmutterlaugen wurden vereinigt (212 mg) und wie oben nochmals aus Methanol-Wasser heiss fraktioniert und aus Methanol-Äther kristallisiert. Erhalten wurden noch 107 mg Gofrusid vom Smp. 232—258° (H₂SO₄-Färbung ohne Violetstich nach 2 Std.) sowie 18 mg Körner vom Smp. 226—244° (Farbreaktion wie Gofrusid, aber mit Lilastich nach 4 Std.). Es handelt sich um ein Gemisch von Gofrusid mit etwas Frugosid.

Ausbeute aus diesem Extrakt: 678 mg reines oder nahezu reines Gofrusid; 113 mg reines Frugosid; 18 mg Gofrusid mit etwas Frugosid verunreinigt.

Trennung des Chloroform-Extrakts. Die 0,82 g Chloroform-Extrakt wurden an 25 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol (19:1) eluierte Fraktion Nr. 5 (190 mg) gab nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol-Äther 114 mg Gofrusid vom Smp. 228—260° (Farbreaktion mit konz. H₂SO₄ ohne Lilastich nach 2—4 Std.). Die mit Chloroform-Methanol von 10—50% Methanolgehalt eluierten Fraktionen Nr. 6—16 (614 mg) gaben aus Methanol-Äther 0,44 g Kristallgemisch.

Zur Trennung wurden die 0,44 g Kristallgemisch zuerst zweimal aus Methanol-Wasser heiss kristallisiert. Sie gaben dann aus Methanol-Äther 179 mg Gofrusid vom Smp. 230—255° (Farbreaktion mit leichtem Lilastich nach 4 Std.). Die beiden wässrigen Mutterlaugen lieferten beim Stehen bei 20° 134 mg rohes Frugosid in farblosen Nadeln mit Doppel-Smp. 160—170°/228—242° und diese aus Methanol-Äther 119 mg reines Frugosid vom Doppel-Smp. 165—170°/238—242°. Aus den vereinigten Mutterlaugen konnten aus Wasser in der Hitze, dann aus Methanol-Äther noch 31 mg unreines Gofrusid vom Smp. 229—238° erhalten werden, das bei der Farbreaktion mit konz. H₂SO₄ nach ca. 4 Std. deutliche Lilafärbung zeigte.

Ausbeute aus diesem Extrakt: 114 mg Gofrusid, fast rein; 210 mg Gofrusid, das noch merkliche Mengen Frugosid enthält; 134 mg Frugosid.

Trennung des Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extraktes. Die 5,7 g Material wurden an 170 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol von 10—50% Methanolgehalt eluierten Anteile (3,47 g) gaben aus Methanol-Äther und Methanol-Wasser 1,68 g Frugosid in farblosen Nadeln vom Doppel-Smp. 165—170°/225—242°.

Versuch zur Umsetzung von Gofrusid mit Reagens T von Girard & Sandulesco. 20 mg Gofrusid vom Smp. 240—252° wurden mit 1 cm³ abs. Methanol, 18 mg Reagens T und 0,04 cm³ Eisessig 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Die Aufarbeitung²⁾ gab 20 mg nicht in Reaktion getretenes Material. Aus Methanol-Äther 15 mg farblose Prismen, Smp. 235—250°, Mischprobe ebenso.

Frugosid. Aus Methanol-Wasser lange farblose Nadeln, Doppel-Smp. 160—170°/237—242°. Nach mehrwöchigem Liegen in verschlossenem Glas zeigten die Kristalle nur

¹⁾ Frugosid ist in heissem Wasser relativ gut löslich.

²⁾ O. Schindler & T. Reichstein, Helv. 34, 521 (1951).

noch Smp. 240—242°. Aus Methanol-Äther wurden Nadeln mit ähnlichem Doppel-Smp. oder direkt die hochschmelzende Form erhalten. $[\alpha]_D^{21} = -17,4^0 \pm 2^0$ ($c = 1,205$ in 80-proz. Methanol).

11,99 mg Subst. zu 0,9935 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{21} = -0,21^0 \pm 0,02^0$

Das über CaCl₂ ohne Vakuum getrocknete Präparat gab bei der Trocknung 6,00% Gewichtsverlust; für 2 Kristallwasser berechnet 6,29%.

3,055 mg Subst. gaben 7,31 mg CO₂ und 2,26 mg H₂O (*S. W.*)

2,550 mg Subst. verbr. 0 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃ (*Zeisel-Vieböck*) (OAB)

8,142 mg Subst. (Dihydrat) verbr. 0,314 cm³ H₂ (0°, 760 Torr)

(Hydrierung mit Pt in Eisessig) (ETH.)

C₂₉H₄₄O₉ Ber. C 64,90 H 8,26 – OCH₃ 0% DZ 1,00

(536,64) Gef. „ 65,30 „ 8,28 „ 0% „ 0,99

Legal-Reaktion: positiv (rot), *Keller-Kiliani-Reaktion*: negativ (farblos). Farb-reaktion mit konz. H₂SO₄: blassgelb (0'), orange (45'), orange-braun (2 Std.), lila (4 Std.)¹⁾. UV.-Absorptionsspektrum siehe theoret. Teil. Die Substanz ist in Chloroform-Methanol-Gemischen, in wässrigem Methanol und wässrigem Äthanol sowie in heissem Wasser leicht löslich. Mässig löslich in Methanol und Chloroform, schwer in Äther und kaltem Wasser.

Frugosid-acetat. 20 mg Frugosid vom Doppel-Smp. 160—170°/225—240° in 0,5 cm³ abs. Pyridin und 0,5 cm³ Acetanhydrid 2 Tage bei 20° stehengelassen. Übliche Aufarbeitung gab 25 mg rohes Acetat, das auch nach Chromatographie an Al₂O₃ bisher nicht kristallisierte.

Frugosid-tetrabenzoat. 50 mg Frugosid vom Doppel-Smp. 160—165°/226—236° (1 Std. bei 0,01 Torr und 80° getrocknet) wurden in 1 cm³ abs. Pyridin gelöst, bei 0° mit 0,5 cm³ reinem Benzoylchlorid versetzt und 16 Std. unter H₂O-Ausschluss bei 18° stehengelassen. Dann wurde 0,5 cm³ Methanol zugegeben und weitere 3 Std. stehengelassen. Übliche Aufarbeitung mit Chloroform-Äther (1:3) gab neutrales Rohprodukt (bei 0,02 Torr und 80° getrocknet). Es wurde an 4 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Benzol-Chloroform (4:1) und (3:2) eluierten Anteile (81 mg) gaben aus Aceton-Methanol, dann aus Aceton-Benzol-Äther 70 mg rechteckig abgeschnittene, flache Nadeln, Smp. 160—162°, $[\alpha]_D^{24} = +15,5^0 \pm 2^0$ ($c = 1,223$ in Chloroform).

12,13 mg Subst. zu 0,9935 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{24} = +0,19^0 \pm 0,02^0$

3,980 mg Subst. gaben 10,438 mg CO₂ und 2,240 mg H₂O (OAB)

C₅₇H₆₀O₁₃ (953,05) Ber. C 71,83 H 6,35% Gef. C 71,57 H 6,30%

Beständigkeitsprüfung mit CrO₃. 20 mg Frugosid-tetrabenzoat vom Smp. 156—159° wurden in 1 cm³ reinstem Eisessig gelöst, mit 0,1 cm³ 2-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung (= 2 mg CrO₃) versetzt und 4 Std. bei 20° stehengelassen, worauf noch CrO₃ vorhanden war. Dann wurde mit 0,1 cm³ Methanol versetzt und 16 Std. stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 18 mg farbloses Neutralprodukt. Aus Benzol-Äther 13 mg Nadeln vom Smp. 155—160°, Mischprobe mit Ausgangsmaterial keine Depression.

Die Mikroanalysen wurden in folgenden mikroanalytischen Laboratorien ausgeführt: Eidg. Techn. Hochschule Zürich (Leitung *W. Manser*) (ETH.), Org.-chem. Anstalt der Universität Basel (Leitung *E. Thommen*) (OAB), bei Frau Dr. *S. Sobotka* und Herrn Dr. *E. Wiesenberger*, Graz (*S. W.*).

Zusammenfassung.

Aus den Samen von *Gomphocarpus fruticosus* (*L.*) *R. Br.* wurde ein zweites krist., stark herzwirksames Glykosid isoliert. Es wird als Frugosid bezeichnet, besitzt die Summenformel C₂₉H₄₄O₉ und liess sich durch ein krist. Tetrabenzoat charakterisieren.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

¹⁾ Reines Gofrusid war auch nach 4 Std. blassbraun, nie lila.