

found for the autoxidation of the cuprous imidazole complex. This can be explained by the assumption of a rapidly playing equilibrium proceeding the rate determining step.

Institut für anorganische Chemie
Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] TH. KADEN & S. FALLAB, *Chimia* 20, 51 (1966).
- [2] H. NORD, *Acta chem. scand.* 9, 430 (1955); O. A. CHATTYKYAN, G. S. CHYTYAN & G. DARBINYAN, *Nauch. Trudy Erevan Gosudarst. Univ. Ser. Khim. Nauk.*, 53 [3], 95 (1956); 60 [4], 125 (1957).
- [3] L. GRAF & S. FALLAB, *Experientia* 20, 46 (1964).
- [4] L. C. CLARK, *Trans. Amer. Soc. artificial internal Organs* 2, 41 (1956).
- [5] P. HEMMERICH & C. SIGWART, *Experientia* 19, 488 (1963).
- [6] Q. H. GIBSON, *Disc. Faraday Soc.* 17, 137 (1954); Q. H. GIBSON & L. MILNES, *Biochem. J.* 97, 161 (1964).
- [7] I. YAMAZAKI, H. S. MASON & L. PIETTE, *J. biol. Chemistry* 235, 2444 (1960).
- [8] M. VON STACKELBERG & H. VON FREYHOLD, *Z. Elektrochem.* 46, 120 (1940).
- [9] N. C. LI, J. M. WHITE & E. DOODY, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 6219 (1954).
- [10] S. FALLAB, *Angew. Chem.*, im Druck.

55. Gymnemasäure, das antisaccharine Prinzip von *Gymnema sylvestre* R. BR.

Isolierungen und Identifizierungen¹⁾

Glykoside und Aglykone, 288. Mitteilung²⁾

von W. Stöcklin, E. Weiss und T. Reichstein

(13. I. 67)

Einleitung. – Die Blätter von *Gymnema sylvestre* R. BR. (*Asclepiadaceae*), einer in Indien und Afrika heimischen Schlingpflanze, besitzen eine interessante physiologische Wirkung. Nach dem Kauen eines Blattes geht das Geschmackempfinden für süsse Substanzen vollständig verloren. Um die Mitte des letzten Jahrhunderts berichtet zum erstenmal FALCONER [2] über diese seltsame Eigenschaft dieser Pflanze. Diese Wirkung soll sich über 2 bis 24 Std. erstrecken. Beim Genuss von süssem Tee ist wohl das Aroma noch voll vorhanden, jedoch lässt sich der süsse Geschmack nicht mehr feststellen. Fester Zucker erscheint wie Sand, der im Munde langsam zerfließt. HOOPER [3] stellte fest, dass das wirksame Prinzip sauren Charakter besitzt und nannte es Gymnemasäure. Er beobachtete als erster, dass auch das Geschmackempfinden für bittere Substanzen (Chininsulfat), wenn auch in viel geringerem Ausmasse, abgeschwächt wurde. Auf die Geschmacksempfindung von salzigen und sauren Substanzen hat das wirksame Prinzip keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu berichtet KIESOW [4], dass Gymnemablätter auch einen Einfluss auf das Geschmackempfinden von salzig und sauer besitzen. Auf Tast- und Temperaturreize übt jedoch die Gym-

¹⁾ Auszug aus Dissertation W. STÖCKLIN, Basel 1965.

²⁾ 287. Mitteilung: vgl. H. ALLGEIER *et al.* [1].

nemasäure keinerlei Wirkung aus. Nach WARREN & PFAFFMAN [5] wird die Geschmacksempfindung bei Zucker- und Saccharinlösungen durch das Kauen einiger Blätter in ungefähr gleicher Grösse abgeschwächt. Kürzlich hat YACKZAN [6] [7] über grössere physiologische Untersuchungen von *Gymnema sylvestris* berichtet. Die Wurzeln von *Gymnema sylvestris* wurden lange Zeit von den Hindus als Heilmittel gegen Schlangenbisse verwendet [3]. Nach MHASKAR & CAIUS [8] besitzen die Blätter keine bactericide Wirkung *in vitro*. Die Blätter wirken erregend auf Herz und Blutkreislauf, erzeugen Appetitlosigkeit, Durchfall, Asthenie usw., erhöhen die Harnsekretion und aktivieren den Uterus. Sie erzeugen Hypoglykämie; die Droge wirkt jedoch nicht direkt auf den Kohlenhydrat-Stoffwechsel, sondern nur indirekt durch Erregung der Insulinsekretion des Pankreas. CHOPRA *et al.* [9] konnten jedoch bei subkutaner Injektion verschiedener Extrakte bei Kaninchen keine Senkung des Blutzuckergehalts feststellen.

Frühere chemische Untersuchungen. – HOOPER [3] [10] berichtet als erster über chemische Untersuchungen der Blätter. Er konnte Weinsäure und einen linksdrehenden reduzierenden Zucker nachweisen. Daneben fand er Gymnemasäure, die zu 6% als Kaliumsalz in den Blättern enthalten ist. Sie lässt sich aus wässriger Lösung durch Zusatz von Mineralsäure ausfällen und als grünlich-schwarzes Pulver erhalten. C, H-Bestimmung, Metallbestimmung des Silber- und Bleisalzes sowie Titration mit Natronlauge stimmten gut mit der Formel $C_{32}H_{55}O_{12}$ (bei Annahme einer einbasischen Säure) überein. Bei längerem Kochen von Gymnemasäure mit verd. HCl verlor sie ihre geschmacks lähmende Eigenschaft. Das Reaktionsgemisch reduzierte FEHLING'sche Lösung, demnach wurde Gymnemasäure von HOOPER als ein Glykosid bezeichnet. POWER & TUTIN [11] isolierten aus den Blättern Hentriacontan $C_{31}H_{64}$, Ameisensäure, Buttersäure, ein Cyclohexanpentol (das die Autoren als *l*-Quercitol bezeichnen) [12] und einen Zucker (racemische Glucose), der als Osazon vom Smp. 218–219° charakterisiert wurde. Das Cyclohexanpentol wurde später von POSTERNAK & SCHOPFER [13] als Viburnitol identifiziert. Über die Gymnemasäure haben POWER & TUTIN noch folgendes berichtet: Die C, H-Bestimmung stimmte gut mit den Werten von HOOPER [10] überein. Nach alkalischer oder saurer Hydrolyse war die antisaccharine Eigenschaft (Bezeichnung stammt von POWER & TUTIN [11]) verschwunden. Da sich nach der sauren Hydrolyse, im Gegensatz zur Angabe von HOOPER [10], kein Zucker nachweisen liess, glauben diese Autoren, dass es sich bei der Gymnemasäure nicht um ein Glykosid handelt. Nach der KOH-Schmelze konnten sie Essigsäure und eine Molekelverbindung von Protocatechusäure mit *p*-Hydroxybenzoesäure nachweisen. Alkalische Oxydation mit Kaliumpermanganat ergab nach dem Ansäuern heftige CO_2 -Entwicklung; ebenso konnte Ameisensäure nachgewiesen werden.

Nach portugiesischen Autoren [14] sollen die Blätter Fette, ätherische Öle, Tannin, Anthrachinonderivate, Saponine und Harzsäuren enthalten. 1958 konnten KHASTGIR *et al.* [15] aus den Blättern Lupeol, β -Amyrin und Stigmasterin isolieren. Sie erhielten das antisaccharine Prinzip als amorphes Pulver, das sich auch nach Chromatographie an Kieselgel nicht kristallisieren liess. Auch MANNI [16], der über die Isolierung mehrerer Stoffe berichtet, konnte wenig über die Gymnemasäure aussagen. Die antisaccharine Eigenschaft soll in gereinigten Extrakten gegenüber der-

jenigen der Blätter verschwindend klein sein. Hydrolyse roher Gymnemasäure gab stark reduzierende Stoffe, deren Verhalten gegenüber Sprühreagenzien vermuten liessen, dass es sich dabei nicht um Zucker handle.

Die reinsten bisher beschriebenen Präparate dürften von WARREN & PFAFFMAN³⁾ [5] sowie von YACKZAN [7] stammen. Beide Arbeitsgruppen erhielten das wirksame Prinzip in kristalliner Form vom Smp. ca. 190° (Zers.). Nach WARREN & PFAFFMAN besitzen diese hochgereinigten Präparate maximale Wirkung. Das Molekulargewicht der Gymnemasäure wird mit 805 angegeben. Nach saurer Hydrolyse der als Glykosid betrachteten Gymnemasäure wurden Glucose, Arabinose und in kleinen Mengen Glucuronsäurelacton erhalten. Das Hydrolysat war physiologisch unwirksam⁴⁾. Nach YACKZAN soll Gymnemasäure die folgenden Funktionen besitzen: OH, COOH und 1 oder 2 glykosidische Bindungen. Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge gab einen Wert von ca. 600.

Eigene Untersuchungen

Beschaffung des Ausgangsmaterials. – Es standen uns zur Verfügung:

a) 200 g getrocknete Blätter, 660 g Zweige und 450 g Wurzeln (Herbarnummer POLE EVANS 6306), gesammelt von Dr. I. B. POLE EVANS im Februar 1962 ca. 50 Meilen südwestlich Umtali, Süd-Rhodesien, in einigen felsigen Hügeln nahe der Einmündung des Nocheke-River in den Sabi-River⁵⁾.

b) 10 kg getrocknete Blätter, erhalten am 5. Sept. 1962 von CIBA OF INDIA LTD., Scientific Department, Bombay-1, India; gesammelt von T. S. NAGESH RAO, Anfang August 1962, in der Gegend von Mahabaleshwar (ca. 150 km südöstlich Bombay)⁶⁾.

c) 335 g Blätter, 335 g grüne Früchte und 225 g Zweige, gesammelt von Dr. I. B. POLE EVANS ca. 50 Meilen westlich von Beira, Portug.-Ostafrika, im Juli 1962⁵⁾. Alle Pflanzenproben erreichten uns in gutem Zustand.

Orientierende Untersuchung von *Gymnema sylvestre* R. Br. – Um zusätzliche Anhaltspunkte über die Art der Inhaltsstoffe von *Gymnema sylvestre* R. Br. zu erhalten, haben wir die Blätter, Äste und Wurzeln der Probe a) einer orientierenden, chemischen Prüfung nach ABISCH & REICHSTEIN [18] unterzogen. Ergebnisse s. Tab. 1.

Danach enthält die Pflanze weder Alkaloide noch Cardenolide. Glykoside finden wir in den Blättern und wenig in den Wurzeln, wobei 2-Desoxyzucker nur in den Blättern und nur in kleinen Mengen auftreten. Blätter, Wurzeln und Äste zeigen stark bitteren Geschmack und enthalten saponinartige Stoffe.

Präparative Isolierung der Gymnemasäure. – Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, lieferten bei der von uns geprüften Probe die Wurzeln eine erheblich grössere Menge an Extrakten. Diese waren zudem viel weniger durch dunkel gefärbte Begleitstoffe

³⁾ Wir erhielten von Prof. R. M. WARREN, Shimer College, Mount Caroll, Ill., eine Probe seiner krist. Gymnemasäure (Smp. 203°) und eine Probe des rohen Kaliumsalzes (Smp. 245°). Wir möchten ihm auch hier für sein Material, das uns für Vergleichszwecke sehr wertvoll war, bestens danken.

⁴⁾ R. M. WARREN & C. PFAFFMAN, unveröffentlichte Resultate, vgl. [17].

⁵⁾ Wir danken Herrn Dr. I. B. POLE EVANS auch hier bestens für dieses Pflanzenmaterial.

⁶⁾ Wir danken der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, insbesondere den Herren Dres. J. MÜLLER und H. HÜRLIMANN, Basel, auch hier bestens für ihre Hilfe bei der Beschaffung dieses Pflanzenmaterials.

Tabelle 1. *Orientierende chemische Untersuchung*

Pflanzenteil	Bitterer Ge- schmack	Menge in mg pro g Pflanzen- material			Alkaloide		Xant- hydrol- Probe [19]		Prüfung auf ge- bundene normale Zucker [20]		KEDDE- Reaktion [21]		Schaum- höhe in mm
		d	a	b	c	a	b	a	b	a	b	d	
Extrakt ⁷⁾													
Blätter	++	2,2	0,5	–	+	+	++	/	–	–			12
Wurzeln	++	6,0	2,9	–	–	–	+	+	–	–			27
Äste	++	0,1	1,5	–	–	–	/	/	–	–			35

/ = nicht geprüft, – = negativ, + = schwach positiv, ++ = positiv

Bezeichnung der Extrakte (vgl. auch [18]): a = Chloroform-Extrakt, b = Chloroform-Alkohol-(3:2)-Extrakt, c = Extrakt zur Prüfung auf Alkaloide, d = roher wässriger Auszug.

verunreinigt als die Blattextrakte. – Um unsere Resultate besser mit denen früherer Autoren vergleichen zu können, haben wir trotzdem die Blätter verwendet. Eine Untersuchung der Wurzeln wäre aber ebenfalls lohnenswert, da die daraus erhaltenen Extrakte ebenfalls stark antisaccharin wirken. In mehreren Vorversuchen⁸⁾ mit den Proben a) und b) wurde nach einer guten Methode zur Isolierung des wirksamen Prinzips gesucht. Es lässt sich als Salz aus wässrigen Lösungen mit Chloroform-Alkohol-Gemischen ausschütteln. Das Salz ist in Wasser löslich. Mit Mineralsäuren lässt sich das wirksame Prinzip ausfällen. Eine weitere Anreicherung der freien Säure gelingt mit Aceton⁹⁾, in dem die wirksamen Anteile in Lösung gehen. Nach Chromatographie des Aceton-löslichen Materials an Kieselgel und an Nylonpulver wurde ein Präparat (Gymnemasäure A) erhalten, das sich aus Diäthylcarbonat teilweise kristallisieren liess (Smp. 192°) und in vier Dünnschichtsystemen (Systeme I, II, III und IV, siehe Exp. Teil) nur *einen* Fleck gab. Die Laufstrecken waren in all den vier Systemen gleich wie jene der Gymnemasäure von WARREN [5]. Es zeigte sich jedoch, dass trotzdem noch ein Gemisch von nah verwandten Stoffen vorlag, das sich im System Butylformiat-Methyläthylketon-Ameisensäure-Wasser-(5:3:1:1) in vier Komponenten (A₁, A₂, A₃ und A₄, vgl. Fig. 1) auftrennen liess. Das Präparat von WARREN gab dabei nur die Flecke A₁ (ca. 70%) und A₂ (ca. 30%) (vgl. Fig. 1). Es ist erstaunlich, dass es WARREN & PFAFFMAN gelungen ist, trotz relativ einfacher Manipulationen, ein wenn auch nicht völlig, so doch weitgehend reines Präparat zu erhalten. Möglicherweise hatten sie auch eine günstige Ausgangspflanze zur Verfügung. Andererseits darf aber nicht ausgeschlossen werden, dass obige vier Komponenten möglicherweise aus einer einzigen entstanden sind (siehe unten) und es sich daher teilweise um Kunstprodukte handeln könnte.

Hauptextraktion. – *Extraktion und Vortrennung.* 1,095 kg Blätter der Probe b) (indische Droge) wurden gemahlen und mit Alkohol-Wasser-Gemischen von steigendem Alkoholgehalt extrahiert. Die wässrig-alkoholische Lösung wurde im Vakuum eingengt und mit 2N Schwefelsäure sauer gestellt. Nun wurde hintereinander mit

⁷⁾ Herstellung der Extrakte vgl. Exp. Teil.

⁸⁾ Ausführliche Angaben über die Vorversuche siehe Dissertation W. Ströcklin, Basel 1965.

⁹⁾ Auch YACKZAN [7] berichtet über die Trennmöglichkeit mit Aceton.

Tabelle 2. *Extraktion von 1,095 kg Blättern von *Gymnema sylvestre* R. BR. (Probe b = indische Droge)⁷⁾*

Art des Extraktes		antisaccharine Wirkung ¹⁰⁾	Menge	
			in g	in %
Ae-Extrakt ¹¹⁾	neutral	—	29,587	2,70
	Säuren	+	13,384	1,22
Chf-Extrakt	neutral		0,911	0,08
	Säuren		0,170	0,02
Chf-Alk-(2:1)-Extrakt	neutral	++	51,088	4,66
	Säuren	++	20,639	1,88
Chf-Alk-(3:2)-Extrakt	neutral	++	1,924	0,18
	Säuren	+	4,505	0,41
Total			122,208	11,15

— = negativ, leer = nicht geprüft, + = schwach positiv, ++ = positiv

Äther, Chloroform, Chloroform-Alkohol-(2:1) und Chloroform-Alkohol-(3:2) ausgeschüttelt und durch Waschen mit 2N Sodalösung die «Säuren» aus den Extrakten entfernt. Aus den sodalöslichen Anteilen wurden die «Säuren» nach Ansäuern durch Ausschütteln mit demselben Lösungsmittel wieder gewonnen. Tabelle 2 orientiert über die erhaltenen Ausbeuten.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, findet sich die Hauptmenge der Gymnemasäure als Na-Salz im neutralen Chf-Alk-(2:1)-Extrakt. Dies wurde durch Kontrolle im Dünnschichtchromatogramm bestätigt. Bisher wurde nur dieser Teil weiter untersucht.

Isolierung von A₁. Der neutrale Chf-Alk-(2:1)-Extrakt wurde an Kieselgel mittels Isopropanol-Wasser-Ammoniak-Gemisch chromatographiert. Das Ammoniak war nötig, um die Substanzen zum Laufen zu bringen. Bei Kontrolle im Dünnschichtchromatogramm (DC) ist dieses System (iPr-W-konz.NH₃-(9:1:1)) besonders bequem um das Gemisch A von andern Begleitstoffen abzutrennen; es erlaubt aber keine Unterscheidung zwischen den Komponenten A₁-A₄. Erst später zeigte es sich, dass dieses System für präparative Zwecke ungeeignet ist, da durch das anwesende Ammoniak eine teilweise Verseifung von Estergruppen verursacht wird. Dies dürfte die Ursache sein, dass wir nur eine relativ schlechte Ausbeute an roher Gymnemasäure (A-Fractionen) erhielten. Die an A reichen Fractionen wurden, nach Überführung des Salzes in die freie Säure, mit Diäthylcarbonat extrahiert, an Sephadex gereinigt und erneut an Kieselgel chromatographiert. Hierzu diente dieses Mal Butylformiat-Methyläthylketon-Ameisensäure-Wasser-(5:3:1:1). So konnten 43,5 mg dünn-schichtchromatographisch reines A erhalten werden. Obwohl nach Schätzung der Fractionen der 1. Kieselgelchromatographie im Neutralteil des Chloroform-Alkohol-(2:1)-Extraktes etwa 17 g A enthalten gewesen sein sollten, war die Isolierung von reinem A₁ auf dem genannten Weg äusserst schwierig und verlustvoll. Es ist sehr wahrscheinlich, dass A₁ in saurer oder alkalischer Lösung teilweise in A₂, A₃ und A₄ übergeht.

¹⁰⁾ Geschmacksprobe siehe Exp. Teil.

¹¹⁾ Abkürzungen siehe Einleitung zum Exp. Teil.

Wir vermuten, dass es sich bei A_1 um die native Hauptkomponente des wirksamen Prinzips handelt.

Über die Struktur von Gymnemasäure A_1 . – *Hydrolyse des Glykosids.* Die breiten, starken Banden zwischen $8,5 \mu$ und 10μ des IR.-Spektrums (Fig. 4) sprachen dafür, dass A_1 ein Glykosid sei. Da die Isolierung von reinem A_1 sehr schwierig war, wurde meist mit Gemischen (A) gearbeitet und die Verknüpfung mit A_1 nur durch Reaktionen im Mikromaßstab erbracht. Die Hydrolyse der glykosidischen Bindung verlief lange Zeit ohne befriedigende Resultate. Die energische saure Hydrolyse nach KILIANI [22] vermochte wohl den Zucker abzuspalten. Aber auch bei Hydrolyse des reinsten Präparates A_1 wurde nach Papierchromatogramm (PC) ein Gemisch von drei Zuckern erhalten, und auch das rohe Genin war nach DC (Chf-iPr-(9:1)) ein Gemisch mehrerer Stoffe. Daher versuchten wir den Zucker enzymatisch abzuspalten. Mit Cellulase aus *Aspergillus*-Arten¹²⁾ war uns kein Erfolg beschieden. Die Fermentierung mit Schneckenferment in Na-Acetat-Puffer [23] zeigte die ersten ermutigenden Resultate. Die Schwierigkeit besteht hier vor allem darin, Gymnemasäure in Lösung zu bringen. So versuchten wir es in $0,01N$ $KHCO_3$ -Lösung. Diesmal verlief die Fermentierung in 5 Tagen bei 37° praktisch quantitativ¹³⁾. Der entstandene Zucker zeigte im PC (vgl. Tab. 3) sowie im Elektropherogramm (vgl. Tab. 3) nur *einen* Fleck, mit gleicher Laufstrecke wie Glucuronsäure¹⁴⁾. Eine Unterscheidung zwischen Glucuronsäure und Galakturonsäure war nur im PC (Laufzeit 9 Std., vgl. Tab. 3) möglich. Wurde die Zuckerlösung 14 Tage in $2N$ Schwefelsäure aufbewahrt, so liess sich chromatographisch (vgl. Tab. 3) nur noch ein dem Glucuronsäurelacton entsprechender Fleck nachweisen. Demnach war es wahrscheinlich, dass Gymnemasäure ein Glucuronid ist.

Nunmehr liess sich auch zeigen, dass von den bei saurer Hydrolyse entstandenen drei Zuckern einer mit Glucuronsäure und einer mit Glucuronsäurelacton identisch ist, der dritte jedoch ein Umwandlungsprodukt darstellt, denn drei gleich laufende Flecke wurden auch bei der gleichen Behandlung von Euxanthinsäure [24] (D-Glucuronid von Euxanthon) erhalten. Glucose und Arabinose konnten im Gegensatz zu WARREN & PFAFFMAN⁴⁾ nicht nachgewiesen werden.

Zur sichern Identifizierung des Zuckers wurde noch ein präparativer Versuch ausgeführt, für den das Gemisch vom Konzentrat A (bestehend aus A_1 – A_4) verwendet wurde. Nach Fermentierung wurde die von Geninanteilen befreite wässrige Lösung angesäuert und sofort mit Diazomethan behandelt. Nach Eindampfen zur Trockne wurde acetyliert und das erhaltene Rohprodukt an Kieselgel chromatographiert, worauf sich drei krist. Stoffe (Q, S und T) isolieren liessen. Q war mit nach TSOU & SELIGMAN [25] hergestelltem β -Tri-O-acetyl-D-glucofururonsäurelacton identisch. S erwies sich als ein Gemisch von α - und β -Tetra-O-acetyl-D-glucuronsäure-methylester [26]. T wurde nur in geringer Menge erhalten und konnte bisher nicht identifiziert werden. Demnach enthält Gymnemasäure ausschliesslich D-Glucuronsäure als Zuckerkomponente.

¹²⁾ Produkt der SCHWEIZERISCHEN FERMENT A.G., Basel.

¹³⁾ Wie sich später zeigte, war auch mit hochaktiven Glucosidasen (Präparate E–L. 101–65, 34–65 und 96–65) der Firma RÖHM & HAAS GmbH, Darmstadt, die Abspaltung des Zuckers nicht möglich. Wir danken der genannten Firma auch hier bestens für die Überlassung der Fermentpräparate.

Tabelle 3. Identifizierung der Glucuronsäure nach Papierchromatogramm (PC) und Papierelektrophorese (PE)¹⁵⁾

Stoff	Rf im PC Eg-W-AcOH-(3:3:1)	PE	
		R _{Rhamnose}	R _{Glucose}
Zucker aus Fermentierung als K-Salz	0,192	2,05	1,14
Zucker aus Fermentierung nach Stehen in saurer Lösung ¹⁴⁾	0,420	2,05	1,14
D-Glucose	0,203	1,80	1,00
D-Glucuronsäurelacton ¹⁴⁾	0,415	2,05	1,14
Kalium-D-glucuronat	0,192	2,05	1,14
D-Galakturonsäure ¹⁴⁾	0,183	2,05	1,14

Untersuchung der Genine. Bei der Fermentierung von rohem A erhielten wir die Genine G, J, K und L (vgl. Fig. 2) als Hauptprodukte. Es handelt sich um Neutralstoffe, denn sie wurden bei einem Veresterungsversuch mit Diazomethan nach DC nicht verändert. Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Fermentierung von reinem A₁ zeigte, dass daraus ebenfalls die obenerwähnten vier Genine entstehen. Ferner stellten wir fest, dass dieses Geningemisch bei der alkalischen Hydrolyse eine einzige Substanz (L) lieferte, die wir als Gymnemenin bezeichnen und die in präparativen Ansätzen leicht in Kristallen erhalten werden konnte. Die bei der alkalischen Hydrolyse entstandenen Säuren wurden im Gas-Chromatographen¹⁶⁾ und im Papierchromatogramm untersucht. Dabei konnten die folgenden Säuren nachgewiesen werden: Ameisensäure, Essigsäure, *n*-Buttersäure, Isovaleriansäure¹⁷⁾ und Tiglin-säure.

Nachdem festgestellt war, dass das wirkliche Genin von A₁ ein acyliertes Gymnemenin darstellt, ist verständlich, weshalb bei der Fermentierung mit Schneckenferment, das neben Glykosidasen auch Esterasen enthält, verschiedene Genine entstehen. Es ist aber möglich, dass die Estergruppen teilweise auch durch die Wirkung der schwach alkalischen Lösung (0,01 N KHCO₃) allein verseift wurden.

Bei der Verfolgung der Fermentierung von reinem A₁ im DC entsteht G als unpolarster Fleck. G selbst geht in alkalischer Lösung leicht in J und K und schliesslich in Gymnemenin (L) über. Demnach wäre G das wirkliche Genin von A₁. Bei der Fermentierung von A₂ entsteht zuerst nur K; aber nach einiger Zeit lässt sich auch Gymnemenin nachweisen. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass A₁ und A₂ schon bei der Spaltung der glykosidischen Bindung durch das Schneckenferment auch einen Acylrest verlieren. In diesem Falle wären G resp. K schon partiell verseifte Genine.

¹⁴⁾ Läuft in der Elektrophorese als Salz.

¹⁵⁾ Einzelheiten siehe Exp. Teil.

¹⁶⁾ Wir danken der Firma AEROGRAPH AG, Basel, bestens für die gas-chromatographische Identifizierung der Säuren.

¹⁷⁾ Isovaleriansäure und α -Methylbuttersäure lassen sich im Gas-Chromatographen nicht unterscheiden, so dass vorläufig offenbleiben muss, ob in der Gymnemasäure Isovaleriansäure oder α -Methylbuttersäure, oder ob sogar beide Säuren vorhanden sind.

Nach Chromatographie an Kieselgel liessen sich J in Kristallen, G und K nur amorph, aber in dünn-schichtchromatographisch reiner Form isolieren. Die Acetylierung von Genin J lieferte amorphes J-Acetat, während G- und K-Acetat in Kristallen erhalten werden konnten. Die Genine G, J und K wurden noch nicht weiter

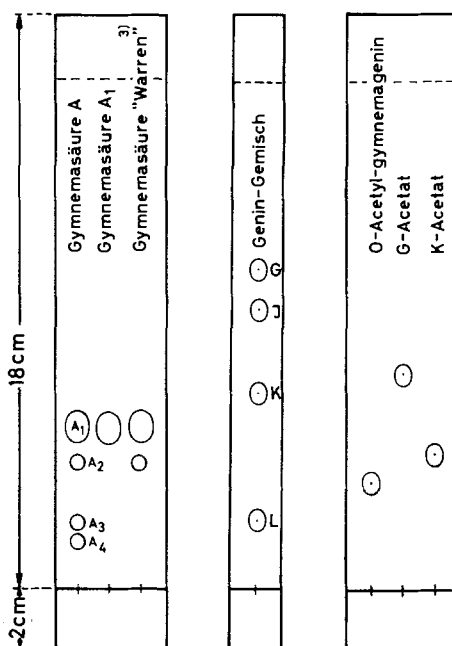


Fig. 1

Bufo-Mek-
HCOOH-W-
(5:3:1:1)^{11,18)}
ca. 90 Min.

Fig. 2

Chf-Me-
(9:1)^{11,18)}
ca. 40 Min.

Fig. 3

Be-Ae-
(1:1)^{11,18)}
ca. 30 Min.

Beispiele für Dünnschichtchromatogramme, schematisiert, aber massgetreu

untersucht, es wurde also nicht geprüft, welche Säuren sie in esterartiger Bindung enthalten. Auch ist die Einheitlichkeit dieser Genine nicht weiter geprüft worden. Möglicherweise sind sie also Gemische von nah verwandten, verschiedenen acylierten Gymnemageninderivaten.

Fig. 1 zeigt ein DC von verschiedenen Präparaten der Gymnemasäure; ausser der Hauptkomponente A₁ sind darin teilweise noch andere Komponenten (A₂–A₄) sichtbar. Fig. 2 zeigt Gymnemagenin (L) sowie die Genine K, J und G, Fig. 3 zeigt einige O-Acetyl-derivate. Die Figuren 4–9 geben IR.-Spektren.

Über die vermutliche Struktur des Gymnemagenins wird in anschliessender Mitteilung berichtet. Danach handelt es sich um ein vermutlich neues Hexahydroxy- Δ^{12} -oleanen. Die Gymnemasäure selbst ist demnach ein saures Saponin, und zwar ein D-Glucuronid des Gymnemagenins, das mit mehreren Säuren verestert ist. Die gas-

¹⁸⁾ Sichtbarmachung der Flecke durch Besprühen mit Cersulfat-Schwefelsäure-Reagens und Erwärmen auf ca. 110° [27].

und papier-chromatographisch nachgewiesenen Säuren (Ameisensäure, Essigsäure, *n*-Buttersäure, Isovaleriansäure¹⁷) und Tiglinsäure) sind aus einem nicht einheitlichen Geningemisch erhalten worden. Es ist daher noch unsicher, ob sie in der reinen Gymnemasäure (A_1) wirklich alle enthalten sind oder ob sie aus verschiedenen ihrer Komponenten (A_1 – A_4) stammen. Auf jeden Fall enthält aber die reine Komponente

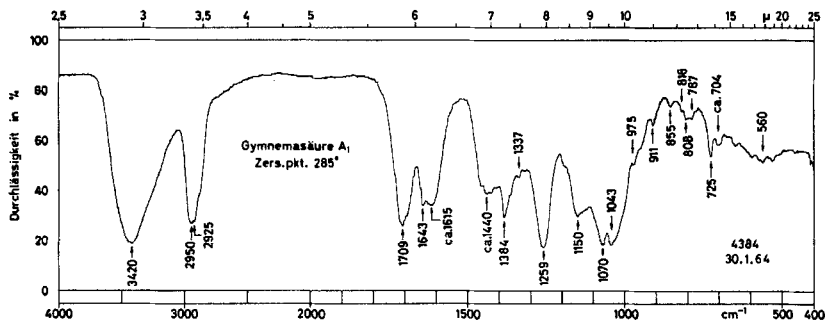


Fig. 4. IR.-Absorptionsspektrum von Gymnemasäure A_1 , Zers.-Pkt. 285° , 1,3 mg fest in $KBr^{19)}$.

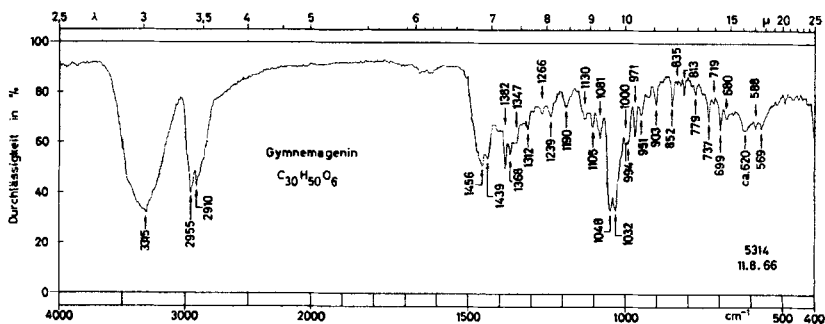


Fig. 5. IR.-Absorptionsspektrum von Gymnemagenin (L), Smp. 328 – 335° (Zers.), 0,96 mg fest in $KBr^{19)}$.

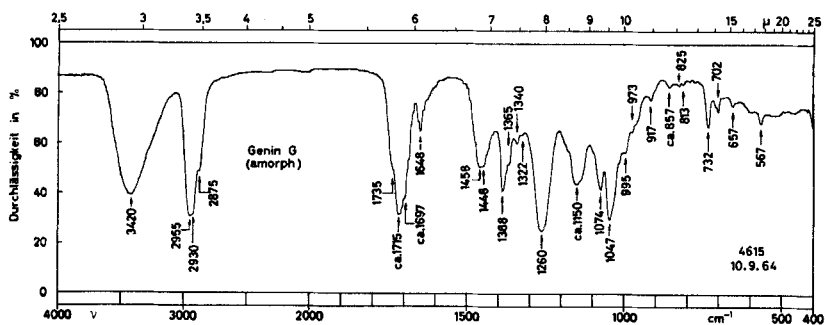


Fig. 6. IR.-Absorptionsspektrum von Genin G, amorph, 1,05 mg fest in $KBr^{19)}$.

¹⁹⁾ Aufgenommen von den Herren CH. SENN und K. AEGERTER auf einem PERKIN-ELMER-IR-Gitter-Spektrophotometer, Modell 125.

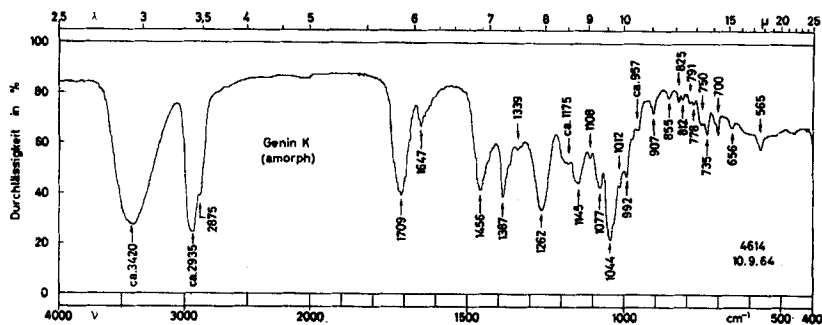


Fig. 7. IR-Absorptionsspektrum von Genin K, amorph, 1,05 mg fest in KBr¹⁸⁾.

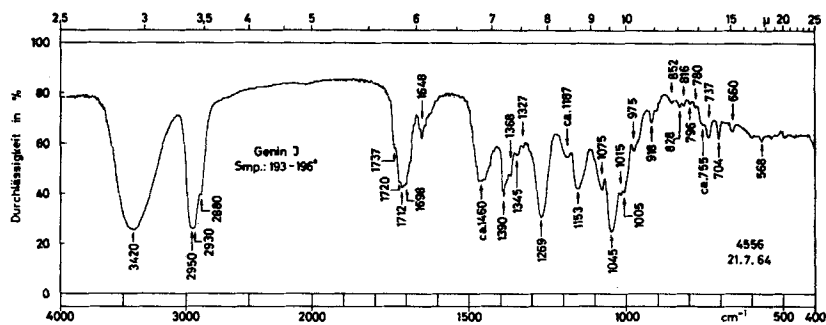


Fig. 8. IR-Absorptionsspektrum von Genin J, Smp. 193–196°, 1,05 mg fest in KBr¹⁸⁾.

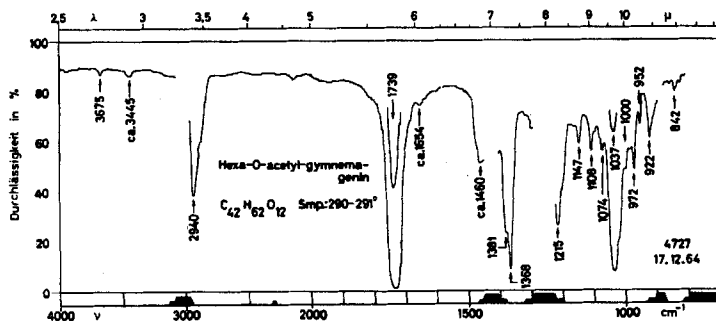


Fig. 9. IR-Absorptionsspektrum von Hexa-O-acetyl-gymnema-genin, Smp. 290–291°, 0,024|0,005 M in CH_2Cl_2 ¹⁹⁾.

A_1 wenn nicht alle, so doch mehrere dieser Säuren im Aglykon gebunden. Ob auch die Zuckerkomponente noch teilweise verestert ist, wurde noch nicht geprüft. Auch ist es noch nicht bewiesen, dass Gymnemasäure nur *eine* Molekel D-Glucuronsäure enthält.

Wir danken dem BUNDESAMT FÜR INDUSTRIE, GEWERBE UND ARBEIT, Bern, für einen Beitrag zur Beschaffung des Pflanzenmaterials, sowie dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit. Ferner dankt der eine von uns (W. S.) dem STIPENDIENFONDS ZUR UNTERSTÜTZUNG VON DOKTORANDEN AUF DEM GEBIETE DER CHEMIE für ein Stipendium, das ihm die Durchführung dieser Untersuchung ermöglichte.

Experimenteller Teil

1. Allgemeine Angaben. – *Abkürzungen:* Ae = Diäthyläther, AcOH = Eisessig, Ac₂O = Essigsäureanhydrid, An = Aceton, Alk = Äthanol, Be = Benzol, Bu = *n*-Butanol, Bufo = *n*-Butylformiat, Chf = Chloroform, DC = Dünnschichtchromatogramm oder Dünnschichtchromatographie, Dmf = Dimethylformamid, Diox = Dioxan, Eg = Essigester, Fmd = Formamid, Fr = Fraktion, Me = Methanol, Mek = Butanon, ML = eingedampfte Mutterlauge, PC = Papierchromatogramm oder Papierchromatographie, PE = Papierelektrophorese, Pe = Petroläther, Pn = Pentan, iPr = Isopropanol, Py = Pyridin, W = Wasser.

Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis $200^\circ \pm 2^\circ$, darüber $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Drehung und für Spektren wurden, wo nicht anders vermerkt, 1 Std. bei 0,01 Torr und ca. 60° getrocknet. Analysenproben wurden über Nacht bei 0,01 Torr und 100° über P₂O₅ getrocknet. – Zur Adsorptions-Chromatographie wurde Kieselgel M_{ERCK}, Korngrösse 0,05–0,20 mm, zur DC Kieselgel G, M_{ERCK}, verwendet. Sichtbarmachung der Flecke mit Cersulfat-Schwefelsäure-Reagens [27]. Systeme: I = Alk-W-konz.NH₃-(18:2:1), II = iPr-W-konz.NH₃-(9:1:1), III = Chf-Me-konz.NH₃-(5:1:1), IV = Bu-AcOH-W-(10:1:1), V = Bufo-Mek-HCOOH-W-(5:3:1:1). Präparative DC auf 20 cm × 20 cm Platten mit Kieselgel G und Zusatz von 0,03% 3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaurem Natrium nach TSCHESCHE *et al.* [28]. PC der Zucker auf WHATMAN Nr. 1, absteigend, ohne Imprägnierung des Papiers mit stationärer Phase. PE: Boratpuffer pH 10,4, 1500 V, ca. 60 mA nach früheren Angaben [29]. Sichtbarmachung der Flecke in PC und PE mit PARTRIDGE-Reagens [30] oder mit dem Reagens nach SCHEFFER [31]. Gas-Chromatographie der Säuren: Apparat: AEROGRAF Hy-FI 600B, Säule: 10% Neopentylglykolsuccinat + 2% H₃PO₄ auf Firebrick 60/80 mesh, $5' \times 1/8''$, $t = 120^\circ$ [32]. NaJO₄-Benzidin-Reaktion: [33]; Bleitetraacetat-Reaktion: [34]. UV-Spektren in Alk.-Acetylierung: 10 mg Substanz wurden in 0,5 ml abs. Py gelöst und mit 0,4 ml Ac₂O versetzt. Nach 16 Std. bei 35° wurde im Vakuum bei max. 50° abgedampft, der Rückstand in Chf aufgenommen, mit 2N HCl, 10-proz. KHCO₃-Lösung und W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft.

Geschmacksprobe: 2 mg Substanz (bei Rohextrakten 5 mg) wurden eine Minute im Mund gekaut. Nach dem Spülen des Mundes wurde das Geschmacksempfinden mit 2- und 4-proz. Zuckerrösung geprüft.

2. Orientierende chemische Untersuchung. – Die Herstellung sowie die Prüfung der Extrakte erfolgte genau nach der bei ABISCH & REICHSTEIN [18] beschriebenen Methode. Ausbeuten und Resultate s. Tabelle 1 (im theor. Teil).

3. Hauptextraktion (indische Droge). – **3.1. Extraktion und Vortrennung.** – 1,095 kg gemahlene Blätter der Probe b) wurden mit 2,5 l W angeteigt und 1 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurden 2,5 l Alk zugegeben und nach 30-minütigem Erwärmen auf 30 – 40° abfiltriert. Nun wurde noch 9mal mit je 3 l W-Alk-Gemischen von steigendem Alkoholgehalt extrahiert. Alle 10 Extrakte wurden vereinigt und zur Stammlösung (ca. 1 l) konzentriert. Um das Schäumen beim Einengen zu vermindern, wurde etwas Octanol zugegeben.

Die Stammlösung (pH 7) wurde nun mit 170 ml 2N H₂SO₄ sauer gestellt (pH 3–4). Dann wurde 10mal mit je 1 l Ae ausgeschüttelt. Die Ae-Lösungen wurden 2mal mit 300 ml W, 2mal mit 300 ml 2N Sodalösung und 2mal mit 300 ml halbgesättigter Na₂SO₄-Lösung gewaschen. Trocknen und Eindampfen gab den *Neutralteil des Ae-Extraktes*. Die beiden Sodalösungen und die beiden Na₂SO₄-Lösungen wurden vereinigt, mit 2N H₂SO₄ angesäuert und 3mal mit 1 l Ae ausgeschüttelt. Die Ae-Lösungen wurden je 2mal mit 300 ml halbgesättigter Na₂SO₄-Lösung gewaschen. Trocknen und Eindampfen gab den *Säureteil des Ae-Extraktes*.

Die mit Ae ausgeschüttelte Stammlösung, die neutralen Waschwasser und die extrahierte wässrige Phase des Säureteils des Ae-Extraktes wurden vereinigt, mit 2N Sodalösung neutralisiert und auf 1 l eingengt. Nun wurde mit 2N H₂SO₄ angesäuert und 4mal mit 1 l Chf ausgeschüttelt. Die Chf-Lösungen wurden mit 300 ml W, 2mal 300 ml 2N-Sodalösung und 2mal mit 300 ml halbgesättigter Na₂SO₄-Lösung gewaschen. Trocknen und Eindampfen gab den *Neutralteil des Chf-Extraktes*. Die beiden Sodalösungen und die Na₂SO₄-Lösung wurden vereinigt und mit 2N H₂SO₄ angesäuert. Nun wurde 4mal mit 750 ml Chf-Alk-(2:1) ausgeschüttelt und die organischen Phasen 2mal mit 250 ml halbgesättigter Na₂SO₄-Lösung gewaschen. Trocknen und Eindampfen gab den *Säureteil des Chf-Extraktes*.

Nun wurde die Stammlösung 10mal mit 1 l Chf-Alk(2:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit 300 ml W, 3mal 300 ml 2N Sodalösung und 2mal 300 ml halbgesättigter Na_2SO_4 -Lösung gewaschen. Trocknen und Eindampfen gab den *Neutralteil des Chf-Alk-(2:1)-Extraktes*. Die 3 Soda- und die beiden Na_2SO_4 -Lösungen wurden vereinigt und mit 2N H_2SO_4 kongosauer gestellt. Nun wurde 7mal mit 1 l Chf-Alk-(3:2) ausgeschüttelt und die Auszüge 2mal mit 300 ml halbgesättigter Na_2SO_4 -Lösung gewaschen. Trocknen und Eindampfen gab den *Säureteil des Chf-Alk-(2:1)-Extraktes*.

Die Stammlösung wurde nun 8mal mit 1 l Chf-Alk-(3:2) ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden mit 300 ml W, 2mal 300 ml 2N Sodalösung und 2mal mit 300 ml halbgesättigter Na_2SO_4 -Lösung gewaschen. Trocknen und Eindampfen gab den *Neutralteil des Chf-Alk-(3:2)-Extraktes*. Die beiden Soda- und die beiden Na_2SO_4 -Lösungen wurden vereinigt und mit 2N H_2SO_4 angesäuert. Nun wurde 7mal mit 1 l Chf-Alk-(3:2) ausgeschüttelt und die Auszüge 2mal mit 300 ml halbgesättigter Na_2SO_4 -Lösung gewaschen. Trocknen und Eindampfen gab den *Säureteil des Chf-Alk-(3:2)-Extraktes*. Die Ausbeuten der verschiedenen Extrakte sind aus Tabelle 2 (s. theor. Teil) ersichtlich.

3.2. Isolierung des «antisaccharinen Prinzips». – a) *Lokalisierung von A.* Durch Prüfung der Extrakte im DC liess sich folgendes feststellen:

Der Ae-Neutralteil und der Chf-Alk-(3:2)-Säureteil enthalten kein A.

Der Chf-Alk-(2:1)-Neutralteil enthält die Hauptmenge an A (ca. 50% des Extraktes).

Die übrigen 5 Extrakte enthalten höchstens wenig A (max. 20% pro Extrakt).

Wahrscheinlich liegt A im Chf-Alk-(2:1)-Neutralteil als Na-Salz vor.

b) *Chromatographie von 48,654 g Chf-Alk-(2:1)-Neutralteil an 1,5 kg Kieselgel.*

Fr-Nr.	Elutionsmittel (500 ml/Fr)	Menge in g	Geschätzter Gehalt an A	
			in %	in g
1-3	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	0,197	–	–
4	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	0,761	5	–
5	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	2,555	10	0,3
6	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	3,235	50	1,7
7	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	2,066	50	1,0
8	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	4,853	80	3,9
9	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	8,037	70	5,7
10+11	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	11,305	30	3,4
12	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	2,319	30	0,7
13	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	1,567	20	0,3
14	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	0,765	10	0,1
15	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	0,654	10	0,1
16	iPr-W-(4:1) + 5% konz. NH_3	0,451	5	–
17	iPr-W-(2:1) + 5% konz. NH_3	0,420	–	–
18-21	iPr-W-(2:1) + 5% konz. NH_3	5,976	–	–
22-24	iPr-W-konz. NH_3 -(5:4:1)	0,522	–	–
Total		45,683		17,2

c) *Extraktion mit Kohlensäure-diäthylester.* Fr 8 (4,853 g) wurde in 70 ml W gelöst und mit 3 ml konz. HCl angesäuert. Nun wurde 5mal mit Chf-Alk-(4:1) ausgeschüttelt und die Auszüge mit 50 ml halbgesättigter Na_2SO_4 -Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde zur Trockne eingedampft. Dieser Rückstand wurde nun mehrere Male mit 300–500 ml Äthylcarbonat extrahiert. Auf diese Weise liessen sich 4,321 g extrahieren und 432 mg blieben unlöslich. Beim Abkühlen der heissen Extrakte schieden sich oft Mikrokristalle aus, die zwischen 190 und 195° schmolzen. Die Äthylcarbonat-Extrakte zeigten im DC (System I) nur *einen* Fleck und waren mit Substanz A identisch.

d) *Reinheit von A.* – *Behandlung mit Diazomethan.* 2 Proben zu je 2 mg wurden in wenig Me gelöst und mit CH_2N_2 in Ae bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Die eine Probe wurde nach 15 Min., die andere nach 45 Min. zur Trockne eingedampft und im DC auf ihre Reinheit geprüft. Dabei erwiesen sich beide Proben als identisch. Da sie mindestens drei Flecke zeigten, handelt es sich bei A kaum um eine einheitliche Substanz.

Prüfung im DC. In den Systemen I bis IV zeigte A nur einen Fleck. Einzig im System V gelang eine Auftrennung in 4 Flecke, die wir mit A_1 – A_4 bezeichneten. Es war also erwiesen, dass A noch nicht eine einheitliche Substanz war, und wir versuchten nun A_1 , das den Hauptteil von A ausmachte, rein zu isolieren.

e) *Trennung an Sephadex.* 50 g Sephadex (G-25, fine)²⁰⁾ wurden in einem NH_3 - NH_4Cl -Puffer (0,02N NH_3 –0,02N NH_4Cl -(1:1), pH = 9) quellen gelassen. In ein 60 g Al_2O_3 -Rohr eingebracht, hatte die Säule eine Höhe von 32 cm. Mit obigem Puffer eluiert, konnten in 2 Ansätzen aus 552 mg A 58,9 mg und aus 250 mg A 37,6 mg an A_1 angereichertes Material (Präparat 3 resp. 4) erhalten werden. Für beide Ansätze wurde dieselbe Säule verwendet.

f) *Isolierung von reinem A_1 .* In zwei Ansätzen wurde das oben an A_1 angereicherte Material (Präparat 3 resp. 4) an 30 g resp. 18 g Kieselgel chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Bufo-Mek-HCOOH-W-(5:3:1:1).

Präparat 3 (Fr à 4 ml)			Präparat 4 (Fr à 2 ml)		
Fr-Nr.	Menge in mg	Flecke im DC	Fr-Nr.	Menge in mg	Flecke im DC
1–13	14,9	kein A_1	1–18	7,8	kein A_1
14–16	10,0	A_1 + schnellerer Fleck	19–21	3,3	A_1 + schnellerer Fleck
17–21	27,1	A_1	22–27	16,4	A_1
22–24	7,1	A_1 + A_2	28–60	16,8	A_1 – A_4
25–56	18,1	(A_1), A_2			
Total	68,3 mg			44,8 mg	

3.3. Fermentierungen. – 1. *Ansatz:* 1 g A (vgl. 3.2.c.) wurde in 300 ml 0,01N KHCO_3 -Lösung gelöst. Zu dieser Lösung wurden 450 mg Schneckenferment in 25 ml 0,01N KHCO_3 -Lösung gegeben und das Ganze 5 Tage bei 35° im Wärmeschrank aufbewahrt. Zur Entfernung des Ferments wurde mit 5-facher Menge Alk versetzt und durch Kieselgur filtriert. Das Filtrat wurde eingengt und 5mal mit je 100 ml Chf-Alk-(3:2) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft (686 mg). Der Rückstand zeigte im DC (Chf-Me-(9:1)) nur noch sehr wenig Ausgangsmaterial.

2. *Ansatz:* 3,0 g aus Fr 9 (vgl. 3.2.b.) wurden in 180 ml 0,01N KHCO_3 -Lösung gelöst und mit 300 mg Schneckenferment in 20 ml 0,01N KHCO_3 -Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 6 Tage bei 35° stehengelassen. Ohne das Ferment zu entfernen wurde zuerst 6mal mit 200 ml Chf-Alk-(9:1) und dann 6mal mit 200 ml Chf-Alk-(3:2) ausgeschüttelt, die Auszüge über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft (2,408 g Genine). Im DC (Chf-Me-(9:1)) liess sich nur noch wenig Ausgangsmaterial feststellen.

3. *Ansatz:* Ein weiterer Ansatz erfolgte unter entsprechenden Bedingungen mit 2,5 g aus Fr 9 (vgl. 3.2.b.) und gab 1,341 g Genine, die praktisch kein Ausgangsmaterial mehr enthielten.

3.4. Isolierung der Genine. – 1. *Ansatz:* 678 mg fermentiertes Material aus dem 1. Ansatz wurden an 500 g Kieselgel chromatographiert.

Durch Kristallisation aus Chf-Me liess sich aus Fr 53–70 kristallines J von verschiedenem Smp. erhalten, wobei die beste Qualität bei 187–191° schmolz. Durch Umkristallisieren aus Chf-Me stieg der Smp. auf 193–196°. Die Genine G und K konnten bisher nicht kristallisiert werden.

²⁰⁾ Produkt der Firma PHARMACIA, Uppsala, Schweden.

Fr-Nr.	Elutionsmittel (40 ml/Fr)	Menge in mg	Flecke im DC
1–34	Chf + 5% Me	84	schnellaufende Substanzen
35–45	Chf + 5% Me	178	G
46–52	Chf + 5% Me	55	G, J
53–70	Chf + 5% Me	114	J
71–74	Chf + 5% Me	22	J, K
75–95	Chf + 5% Me	163	K
96–125	Chf + 5% Me	44	K + langsamere Substanzen
126–144	Chf + 5% Me	7	langsamer als K
Total		667	

2. Ansatz: 2,408 g fermentiertes Material aus dem 2. Ansatz wurden an 1 kg Kieselgel chromatographiert.

Fr-Nr.	Elutionsmittel (40 ml/Fr)	Menge in mg	Flecke im DC
1–77	Chf + 5% Me	188	schnellaufende Substanzen
78	Chf + 5% Me	14	G + schnellere Substanzen
79–87	Chf + 5% Me	449	G
88–105	Chf + 5% Me	237	G + J
106–135	Chf + 5% Me	209	J
136–155	Chf + 5% Me	108	J, K
156–190	Chf + 5% Me	385	K
191–219	Chf + 5% Me	65	K + langsamere Substanzen
220–269	Chf + 5% Me	48	kein K mehr
Total		1703	

Aus den Fr. 106–135 konnten 189 mg krist. J (Smp. 180–184°) erhalten werden.

3.5. Schonende alkalische Hydrolyse der Genine G, J und K. – Je 10 mg nach DC reines G und K und 5 mg krist. J wurden mit KHCO_3 in W-Me [35] bei 20° verseift. Nach 19 Tagen war die Hydrolyse beendet. Aus allen drei Proben wurde krist. L isoliert. Verfolgung der Hydrolyse im DC zeigte, dass G und J über K zu L hydrolysiert wurden. Um grössere Mengen L zu erhalten, wurden die Mischfraktionen aus dem 2. Ansatz (d. h. Fr 88–105 und Fr 191–219) auf die gleiche Art hydrolysiert. Aus 303 mg veresterten Geninen konnten 217 mg rohes L isoliert werden. Durch Kristallisation aus Chf-Me konnte reines L erhalten werden. (Smp. 328–335° unter Zers.).

3.6. Herstellung von Zuckerderivaten und Isolierung reiner Substanzen. – 5 ml Zuckerlösung aus dem 2. Ansatz der Fermentierung wurden mit 2 g Amberlite IR 120 (H-Form) versetzt und 5 Min. unter gelegentlichem Schütteln stehengelassen. Nach dem Abfiltrieren und Waschen mit W und Me und Köhlen auf 0° wurde bis zur bleibenden Gelbfärbung mit CH_2N_2 in Ae versetzt und das Reaktionsgemisch im Vakuum zur Trockne eingedampft. Nun wurden 10 ml Ac_2O , das 5% ZnCl_2 enthielt, zugegeben und 90 Min. auf 60° erwärmt. Nach dem Abdampfen des Ac_2O wurde zwischen W und Chf-Eg-(4:1) verteilt, die organischen Phasen getrocknet und eingedampft.

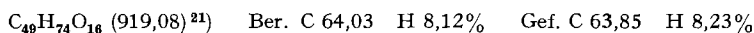
Der Eindampfungsrückstand (309 mg) wurde nun an 120 g Kieselgel mit Be-Ae-(3:1) + 10% Eg chromatographiert.

Fr-Nr. (17 ml/Fr)	Menge roh in mg	Kristalle Menge in mg	Smp.	Substanzen
1-15	10,0	-	-	-
16-18	5,4	-	-	-
19	7,4	1,8	158-159,5°	T
20	17,1	-	-	-
21	17,2	12,0	114-114,5°	S
22-25	27,0	-	-	-
26-30	15,2	11,1	192-195°	Q
31-127	32,0	-	-	-
Total	131,3			

3.7. Isolierung der Säuren. – 50 mg Geningemisch (G, J, K und wenig anderes Material) wurden mit 20 ml 3-proz. methanolischer KOH und 1 ml W 45 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Zugabe von 5 ml W wurde das Me abgedampft und die neutralen Anteile durch Ausschüteln mit 3mal 15 ml Chf-Alk-(9:1) entfernt. Nun wurde mit 2N H₂SO₄ angesäuert, die Lösung mit NaCl gesättigt und 3mal mit 20 ml Ae ausgeschüttelt. Der Ae wurde bis auf ca. 1 ml über eine Kolonne abgedampft. Durch gas-chromatographische Untersuchung dieser Lösung (Bedingungen siehe Einleitung zum Exp. Teil) konnten Essigsäure, *n*-Buttersäure, Isovaleriansäure¹⁷ und Tiglinsäure nachgewiesen werden. Eine kleine Probe obiger Lösung wurde mit CH₂N₂ und Hydroxylamin nach BAYER & REUTHER [36] in die Hydroxamsäuren übergeführt und als solche im PC identifiziert. Dabei liess sich, neben den bereits oben erwähnten Säuren, auch Ameisensäure nachweisen.

4. Die isolierten Stoffe. – *Gymnemasäure A (Präp. WST7)*. Aus Diäthylcarbonat weisse Mikrokristalle, Smp. 192°. Im DC in vier Systemen (I–IV) nur 1 Fleck mit gleicher Laufstrecke wie die von WARREN isolierte Gymnemasäure; im System V aber in A₁, A₂, A₃ und A₄ auftrennbar (Fig. 1).

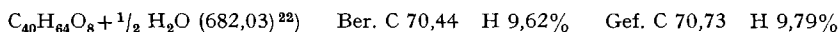
Gymnemasäure A₁ (Präp. WST8). Aus Diäthylcarbonat weisse Mikrokristalle, Zers.-Pkt. 285°. Zeigt im DC im System V nur 1 Fleck (vgl. Fig. 1) mit gleicher Laufstrecke wie der Hauptfleck der von WARREN isolierten Gymnemasäure. Trocknung bis zur Gewichtskonstanz für Analyse (8,35% Gewichtsverlust).



Asche 3,46% (nicht hygroskopisch, vermutlich SiO₂).

IR.-Spektrum vgl. Fig. 4. UV.-Spektrum (log ϵ auf C₄₀H₇₄O₁₆ = 919 berechnet): 196,5 nm (log ϵ = 4,37), 208 nm (S, log ϵ = 4,28), 272 nm (S, log ϵ = 2,75), 279 nm (S, log ϵ = 2,69), 298 nm (S, log ϵ = 2,53).

Genin J (Präp. WST9). Aus Chf-Me feine Nadeln, Smp. 193–196°, [α]_D¹⁸ = +47,8° ± 2° (c = 1,2 in Me).



Laufstrecke im DC vgl. Fig. 2. IR.-Spektrum vgl. Fig. 8.

K-Acetat (Präp. WST10). Aus Ae feine Nadeln, Smp. 278–280°, [α]_D²⁷ = +56,4° ± 3° (c = 0,70 in Chf). Gef. 65,77% C, 8,15% H. Laufstrecke im DC vgl. Fig. 3.

G-Acetat (Präp. WST13). Aus Ae Nadeln, Smp. 218–220°; Laufstrecke im DC vgl. Fig. 3.

²¹) Hypothetische Formel, berechnet für Gymnemasäure-glucuronid, das mit je 1 Mol Tiglin-, Isovalerian-, Essig- und Ameisensäure verestert ist.

²²) Hypothetische Formel berechnet für Mono-O-isovaleryl-mono-O-tiglylgymnemasäure C₄₀H₆₄O₈.

Genin L = Gymnemagenin (Präp. WST14). Aus Chf-Me Prismen, Smp. 328–335°, $[\alpha]_D^{25} = +53,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,95$ in Me).

$C_{30}H_{50}O_6 + \frac{1}{2} H_2O$ (515,71) Ber. C 69,86 H 9,97% Gef. C 69,88 H 10,00%

Farbreaktion mit konz. H_2SO_4 [37]: O' blassgelb, 1' gelb, 2' braungelb, 5–10' gelbbraun, 20–30' gelblichbraun, 60' schokoladenbraun, 120' schwarzbraun. Laufstrecke im DC vgl. Fig. 2. IR.-Spektrum vgl. Fig. 5. Benzidin-Perjodat- und Bleitetraacetat-Reaktion: positiv. Massenspektren und Derivate siehe folgende Mitteilung.

L-Acetat = Hexa-O-acetyl-gymnemagenin (Präp. WST15). Aus Be-Pn Nadeln, Smp. 290 bis 291°, $[\alpha]_D^{25} = +35,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,2$ in Chf).

$C_{48}H_{62}O_{12}$ (758,92) Ber. C 66,46 H 8,23% Gef. C 66,82 66,97 H 8,33; 8,40%

Acetylbestimmung: Ber. 34,01%, Gef. 29,42%.

Tetranitromethan-Probe positiv. IR.-Spektrum vgl. Fig. 9. Massenspektrum und NMR.-Spektrum vgl. folgende Mitteilung.

Substanz Q = β -Tri-O-acetyl-D-glucosyluronsäurelacton (Präp. WST17). $C_{12}H_{14}O_9$ (302); aus Ae Nadeln, Smp. 192–195°, $[\alpha]_D^{25} = +92,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,88$ in Chf). Identifizierung nach IR., Misch-Smp. und Laufstrecke im DC.

Substanz S = α - und β -Tetra-O-acetyl-D-glucuronsäure-methylester (Präp. WST19). $C_{15}H_{20}O_{11}$ (376); aus Ae feine Nadeln, Smp. 114–114,5°, und Prismen, Smp. 179–180°, $[\alpha]_D^{25} = +52,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,01$ in Chf). Molekulargewicht: 371 und 370²³). Enthält nach Drehung und NMR.-Spektrum ca. 55% α - und 45% β -Form.

Substanz T. Krist. aus Ae, Smp. 158–159,5°, umkrist. aus Ae-Pn Drusen, Smp. 159–160°.

Die Mikroanalysen wurden von Herrn E. THOMMEN im Mikrolabor unseres Instituts ausgeführt.

SUMMARY

The isolation, characterisation, purity control and probable structure of gymnemic acid, the antisaccharine principle of *Gymnema sylvestre* R. BR. (*Asclepiadaceae*) has been reported. According to the results, gymnemic acid is the D-glucuronide of a probably new hexahydroxy- Δ^{12} -oleanene which has been named gymnemagenin and which is esterified with various combinations of the following five acids: formic, acetic, *n*-butyric, isovaleric, and tiglic acid. Gymnemic acid is not an absolutely pure substance. It is composed predominantly of gymnemic acid A₁, which is accompanied by components having similar properties, especially the gymnemic acids A₂, A₃ and A₄. The difference between these components probably lies in the absence or presence of one of the five named acids.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. ALLGEIER, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* 50, 456 (1967).
- [2] FALCONER, *Pharmaceut. J.* 7, 351 (1847/48).
- [3] D. HOOPER, *Pharmaceut. J. & Trans.* [3] 17, 867 (1886/87); *Chem. Zbl.* 1887, 800.
- [4] F. KIESOW, *Philosophische Studien* 9, 510 (1894).
- [5] R. M. WARREN & C. PFAFFMAN, *J. appl. Physiol.* 14, 40 (1959); *Chem. Abstr.* 53, 16395 (1959).
- [6] K. S. YACKZAN, *Diss. Abstr.* 25, 7354 (1965).

²³) Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mit der ebullioskopischen Methode von Prof. W. SIMON, ETH, Zürich. Wir danken auch hier Herrn Prof. W. SIMON bestens für die Ausführung dieser Messungen.

- [7] K. S. YACKZAN, *Alabama J. med. Sci.* **3**, 1 (1966); *Chem. Abstr.* **65**, 6163 (1966).
- [8] K. S. MASHKAR & J. F. CAIUS, *Indian J. med. Res., Mem. No.* **16**, 1 (1930); *Chem. Abstr.* **25**, 4972 (1931).
- [9] R. N. CHOPRA, J. P. BOSE & N. R. CHATTERJEE, *Indian J. med. Res.* **16**, 115 (1928); *Chem. Abstr.* **23**, 3744 (1929).
- [10] D. HOOPER, *Chem. News* **59**, 159 (1889); *Chem. Zbl.* **1889**, I, 632.
- [11] F. B. POWER & F. TUTIN, *Pharmac. J.* [4] **19**, 234 (1904); *Chem. Zbl.* **1904**, II, 1418.
- [12] F. B. POWER & F. TUTIN, *J. chem. Soc.* **85**, 624 (1904).
- [13] TH. POSTERNAK & W. H. SCHOPFER, *Helv.* **33**, 343 (1950).
- [14] A. V. DA PIEDADE NORONHA & M. S. T. VELOSO PINTO, *Congr. luso-espan. farm.* **3**, 197 (1952); *Chem. Abstr.* **48**, 11728 (1954).
- [15] H. N. KHASTGIR, S. K. SENGUPTA & P. SENGUPTA, *J. Indian chem. Soc.* **35**, 650 (1958); *Chem. Abstr.* **53**, 10667 (1957).
- [16] P. E. MANNI, *Diss. Abstr.* **25**, 1592 (1964).
- [17] C. PFAFFMAN, *The Sense of Taste*, in «Handbook of Physiology» Section 1, Vol. 1, p. 507, American Physiological Society, Washington 1959.
- [18] E. ABISCH & T. REICHSTEIN, *Helv.* **43**, 1844 (1960).
- [19] M. PESEZ, *Ann. pharmaceut. franç.* **10**, 104 (1952); vgl. auch R. TSCHESCHE, G. GRIMMER & F. SEEHOFER, *Chem. Ber.* **86**, 1235 (1953).
- [20] P. R. O. BALLY, K. MOHR & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 1740 (1951).
- [21] D. L. KEDDE, *Pharmac. Weekbl.* **82**, 741 (1947); vgl. auch I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.* **52**, 643 (1952).
- [22] H. KILIANI, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **63**, 2866 (1930).
- [23] H. HUBER, F. BLINDENBACHER, K. MOHR, P. SPEISER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 46 (1951), bes. p. 68.
- [24] A. ROBERTSON & R. B. WATERS, *J. chem. Soc.* **1937**, 1709.
- [25] K.-C. TSOU & A. M. SELIGMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 5605 (1952).
- [26] W. F. GOEBEL & F. H. BABERS, *J. biol. Chemistry* **106**, 63 (1934).
- [27] D. WALDI, in E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag 1962, p. 496.
- [28] R. TSCHESCHE, G. BIERNOTH & G. WULFF, *J. Chromatogr.* **12**, 342 (1963).
- [29] H. KAUFMANN, P. MÜHLRADT & T. REICHSTEIN, *Helv.* (in Vorbereitung).
- [30] S. M. PARTRIDGE, *Nature* **164**, 443 (1949).
- [31] F. SCHEFFER & R. KICKUTH, *Z. analyt. Chem.* **197**, 116 (1962).
- [32] L. D. METCALF, *Nature* **188**, 142 (1960); B. R. BAUMGARDT, *Dep. Bull. Nr. 1*, Dep. of Dairy Science, Univ. of Wisconsin, Madison, June 1964.
- [33] D. F. MOWERY, *Anal. Chemistry* **29**, 1560 (1957).
- [34] J. G. BUCHANAN, C. A. DEKKER & A. G. LONG, *J. chem. Soc.* **1950**, 3162.
- [35] T. REICHSTEIN & J. V. EUW, *Helv.* **27**, 1181 (1938).
- [36] E. BAYER & K. H. REUTHER, *Angew. Chem.* **68**, 689 (1956).
- [37] J. V. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* **31**, 883 (1948).
-