

239. Galiridosid, ein Iridoidglucosid aus *Galeopsis tetrahit* L. (*Labiatae*)¹⁾

von O. Sticher²⁾

Pharmazeutisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

(11. VII. 70)

Summary. From fresh leaves of *Galeopsis tetrahit* L. (*Labiatae*) a compound observed earlier only by paper chromatography and known as 'Tetrahit-Pseudoindican' or 'Gal. tetr. 47' has been isolated, and its constitution (II) as a new iridoid glucoside has been established. The name of galiridoside is proposed for this compound.

Acetylation of galiridoside gave the tetraacetyl-derivative III. Catalytic reduction of II by Pd/C gave dihydrogaliridoside (IV). Basic hydrolysis of II with Ba(OH)₂ gave desepoxydihydroxygaliridoside (VI). Reduction of galiridoside by lithium and ammonia yielded among other compounds a small amount of dideoxy-aucubin (XI), isolated as its tetraacetate XII.

The NMR. spectra of galiridoside and its derivatives support the proposed structure and configuration.

Einleitung. – Auf der Suche nach Pseudoindikanen, die heute als Iridoide oder Iridoidglucoside bezeichnet werden, entdeckte *Wieffering* [3] im Jahre 1966, dass *Galeopsis tetrahit* L. eine positive Pseudoindikan- oder *Trim & Hill*-Reaktion [4] gibt. Er bezeichnete den durch diese Reaktion und papierchromatographisch charakterisierten Stoff als «Tetrahit-Pseudoindikan». *Adema* [5] fand ebenfalls auf papierchromatographischem Wege in *Galeopsis tetrahit* das Tetrahit-Pseudoindikan (von ihm Gal. tetr. 47 benannt).

Wir haben das von *Wieffering* und von *Adema* beobachtete Tetrahit-Pseudoindikan³⁾ isoliert und seine Struktur aufgeklärt; wir schlagen für diese Substanz den Namen Galiridosid vor.

Ergebnisse und Diskussion. – Das aus frischen Blättern von *Galeopsis tetrahit* L. isolierte Galiridosid (II), C₁₅H₂₂O₉ (MG. 346), Smp. 189,5–191,5° (Zers.), $[\alpha]_D^{23} = -77,9^\circ$ (H₂O), ist äusserst instabil in Gegenwart von Mineralsäuren. Bei der *Trim & Hill*-Reaktion [4] tritt Blaufärbung ein. Beim Erwärmen mit konz. Salzsäure entsteht eine violette Färbung unter Abscheidung eines dunkeln Niederschlages; das Aglucon lässt sich auf diese Weise nicht fassen, hingegen kann im Filtrat D-Glucose nachgewiesen werden.

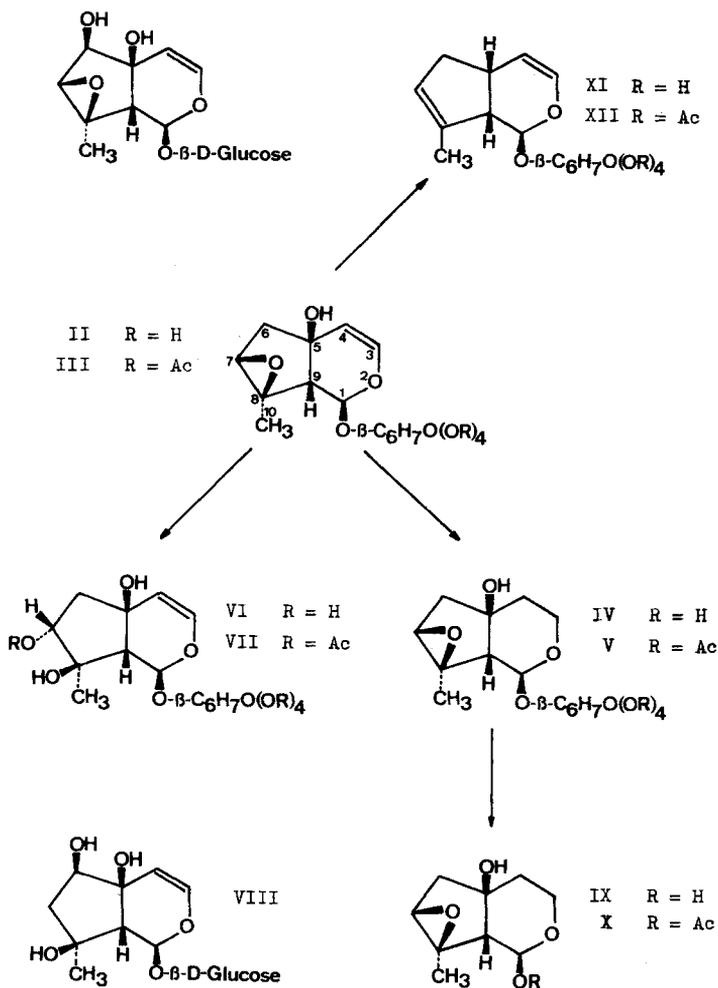
Die Anwesenheit der für die C₉-Iridoide charakteristischen Enol-Äther-Gruppierung –C(4)H=C(3)H–O(2)–C(1) folgt aus dem UV.-Spektrum ((H₂O); $\lambda_{max} = 189,5$ nm; log $\epsilon = 4,18$) und aus dem IR.-Spektrum ((KBr) 1663 cm⁻¹ (C=C)). Das NMR.-Spektrum von II (D₂O) bestätigt diese Annahme (s. Tabelle und Fig. 1). Die zwei

¹⁾ Vorläufige Mitteilung s. [1].

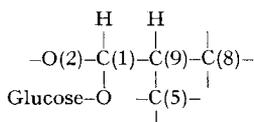
²⁾ Teil der Habilitationsschrift von O. Sticher [2].

³⁾ Für die Bestimmung des Pflanzenmaterials sowie den Vergleich des Galiridosids mit dem Tetrahit-Pseudoindikan sei an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. R. Hegnauer, Laboratorium für experimentelle Pflanzensystematik, Universität Leiden, herzlich gedankt.

Vinylprotonen $-C(4)H=C(3)H-$ erscheinen als Dublette bei 6,90 ppm ($J = 6,2$ Hz; $H-C(3)$) und 5,54 ppm ($J = 6,2$ Hz; $H-C(4)$). Die beiden Dublette fehlen beim Dihydro-Derivat IV.



Für die Gruppierung



sprechen die beiden je einem H entsprechenden Dublette bei 5,95 ppm ($J = 6,2$ Hz; $H-C(1)$) bzw. 2,91 ppm ($J = 6,2$ Hz; $H-C(9)$). Die Zuordnung aller vier Dublette mit der Kopplungskonstante $J = 6,2$ Hz wurde durch Entkoppelungsexperimente bewiesen. Die Signale der Protonen $H-C(4)$ und $H-C(9)$ treten als Dublette auf, was für die Abwesenheit eines H an C(5) und C(8) spricht.

Im NMR.-Spektrum von II erscheint ferner ein Singulett bei 2,01 ppm mit der Intensität von 3 Protonen, welches einer Methylgruppe ohne Nachbarproton zuzuordnen ist ($\text{CH}_3(10)-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}(8)-$). Seine Resonanz bei eher tiefem Feld ist wahrscheinlich dem Epoxid-Ring zuzuschreiben (vgl. Antirrinosid (I), dessen Struktur derjenigen des Galiridosids am nächsten verwandt ist, s. Tabelle und [6]).

Die $\text{H}_2-\text{C}(6)$ -Protonen erscheinen als *AB*-Teil eines degenerierten *ABX*-Systems mit Zentrum bei 2,66 ppm ($-\text{C}(7)\text{H}-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}(6)\text{H}_2-$). Die Kopplungskonstante J_{AB} beträgt 16,2 Hz. Das Proton $\text{H}-\text{C}(7)$ (*X*-Teil) tritt als singulettähnliches Signal bei 4,02 ppm auf und ist teilweise durch die Signale der Glucose-Protonen verdeckt. Die Zuordnung wurde durch Entkoppelungsexperimente bestätigt.

Zuordnung der NMR.-Signale (Gerüstprotonen) ^{a)} ^{b)}

Verb. Nr. Lösungs- mittel	H an C (1)	H an C (3)	H an C (4)	H an C (6)	H an C (7)	H an C (9)	Methyl- gruppe
I D ₂ O	5,95 <i>d</i> (6,2)	6,91 <i>d</i> (6,2)	5,41 <i>d</i> (6,2)	4,53 <i>d</i> (2,0)	4,05 <i>d</i> (2,0)	2,95 <i>d</i> (6,2)	1,95 <i>s</i>
II D ₂ O	5,95 <i>d</i> (6,2)	6,90 <i>d</i> (6,2)	5,54 <i>d</i> (6,2)	2,66 (2) ($J_{AB} = 16,2$)	4,02 <i>s</i> * ^{c)}	2,91 <i>d</i> (6,2)	2,01 <i>s</i>
III CDCl ₃	5,15 <i>d</i> ^{c)} (6,6)	6,27 <i>d</i> (6,2)	4,97 <i>d</i> ^{c)} (6,2)	^{d)}	3,32 <i>s</i> *	2,36 <i>d</i> (6,6)	1,50 <i>s</i>
IV D ₂ O	5,38 <i>d</i> (6,8)	6 Protonen zwischen 2,15–2,80			4,10 <i>s</i> *	2,49 <i>d</i> (6,8)	1,98 <i>s</i>
VI D ₂ O	6,11 <i>s</i> *	6,74 <i>d</i> (6,6)	5,66 <i>d</i> ^{e)} (6,6)	2,71 <i>dd</i> (8,6/14,4) 2,19 <i>dd</i> (11,0/14,4)	4,68 <i>dd</i> (8,6/11,0)	2,88 <i>s</i> *	1,58 <i>s</i>
VII CDCl ₃	5,57 <i>s</i> *	6,11 <i>d</i> (6,2)	4,75–5,37 ^{f)}	2,42 <i>dd</i> (8,8/14,2) 1,80 <i>dd</i> (9,8/14,2)	4,75– 5,37 ^{f)}	2,67 <i>s</i> *	1,14 <i>s</i>
X CDCl ₃	5,32 <i>d</i> (8,4)	3,30–4,10 <i>m</i> (2)	1,70–1,90 <i>m</i> (2)	2,00–2,20 <i>m</i> (2)	3,48 <i>s</i> *	ca. 2,13 ^{d)}	1,37 <i>s</i>

^{a)} NMR.-Signale der Substituenten (Hydroxyl- und Acetylgruppen) und der Glucoseprotonen s. experimenteller Teil.

^{b)} *s* = Singulett, *d* = Dublett, *dd* = Doppeldublett, *m* = Multiplett. *s** = singulettähnliche Signale. Die Zahlen geben die Resonanzlagen in δ -Werten (ppm) relativ zu internem Tetramethylsilan bei CDCl₃-Lösungen bzw. externem Tetramethylsilan bei D₂O-Lösungen an. Die eingeklammerten Zahlen unterhalb der Resonanzlage bedeuten die Kopplungskonstanten, in Hz. (2) bedeutet, dass die Intensität des Signales 2 H-Atomen entspricht. Die Signale der C-Methylgruppe entsprechen in allen Fällen der Intensität von 3 H-Atomen.

^{c)} Signal teilweise verdeckt (durch Glucoseprotonen).

^{d)} Signal verdeckt (durch Acetylprotonen).

^{e)} Dublett mit Feinstruktur.

^{f)} Signal verdeckt (durch Glucoseprotonen).

Mit Essigsäureanhydrid/Pyridin resultiert das kristalline Tetra-O-acetyl-galiridosid (III), $C_{23}H_{30}O_{13}$, welches im IR.-Spektrum ($CHCl_3$) noch eine Bande bei 3525 cm^{-1} (OH) aufweist. Das NMR.-Spektrum ($CDCl_3$) von III lässt bei 2,02–2,10 ppm vier getrennte CH_3COO -Signale sowie ein Singulett bei 3,18 ppm (OH; verschwindet mit D_2O) erkennen. Der Agluconteil von III muss also eine freie Hydroxylgruppe enthalten. Da diese sehr schwer acetylierbar ist, ist sie wahrscheinlich tertiärer Natur.

Im NMR.-Spektrum von III sind die Signale der Protonen an C(1) und C(4) von den Signalen der Glucose-Protonen überlagert. Das Signal der Methylenprotonen an C(6) ist von den Acetyl-Singulettten verdeckt, während die $H_2-C(6')$ bei 4,23 ppm als Multiplett auftreten.

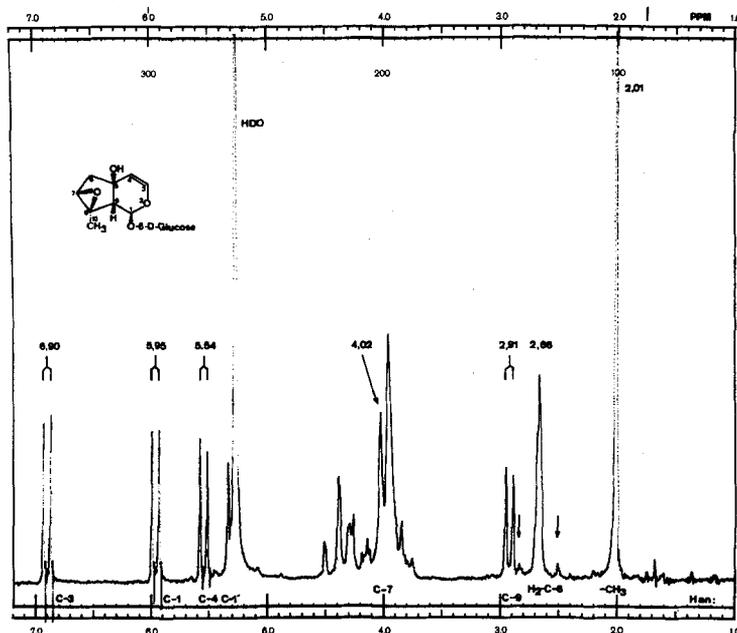
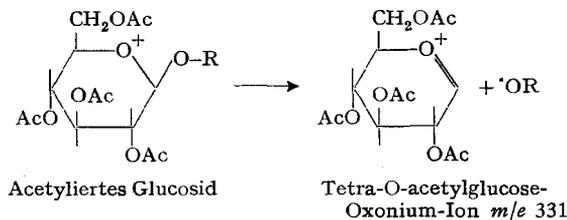


Fig. 1. NMR.-Spektrum (D_2O) von Galiridosid (II)

Nach saurer Hydrolyse von Galiridosid konnte Glucose dünnschichtchromatographisch, durch seine positive Reaktion mit BM-Test Glucose (s. exp. Teil) und durch Herstellung des Osazons nachgewiesen werden. Ferner erscheint im Massenspektrum der Acetylderivate III, V und VII der charakteristische und starke Pik bei m/e 331, welcher bei Pentaacetylglucose sowie bei Anwesenheit eines Tetraacetylglucoserestes auftritt [7], was auf die Gegenwart eines Glucoserestes im Galiridosid hinweist.



Das Auftreten dieses Fragmentes im Massenspektrum von acetylierten Iridoid-glucosiden wurde erstmals von *Souzu & Mitsuhashi* [8] bei Morronisid beschrieben. *Sticher & Schmid* [9] haben es auch bei Theviridosid gefunden.

Die β -glykosidische Verknüpfung der Glucose in II folgt aus dem NMR.-Dublett des Trimethylsilylderivates von II bei 4,52 ppm ($J = 7,0$ Hz) und aus der Spaltbarkeit von IV durch Emulsin. Ein J -Wert von 7 Hz für die Protonen an C(1') und C(2') tritt nur bei β -D-Glucosiden (vgl. [10]) auf.

Weiteren Aufschluss über die Struktur von Galiridosid gab die Hydrierung mit Pd/C in 80-proz. Äthanol. Dem dabei entstandenen Dihydrogaliridosid (IV) sowie dem Tetra-O-acetyl-dihydrogaliridosid (V) fehlen die charakteristische UV.-Absorption der Enol-Äther-Gruppierung um C(2), C(3) und C(4). Ebenso fehlt die IR.-Bande zwischen 1640–1660 cm^{-1} für die C(3)=C(4)-Doppelbindung. Im NMR.-Spektrum von IV und V fehlen die Vinylprotonen, dafür treten im Spektrum von IV (D_2O) Signale für 6 Protonen zwischen 2,15 und 2,80 ppm auf (H_2 -C(3), H_2 -C(4) und H_2 -C(6)). Geblieben sind die Dublette der Protonen an C(1) und C(9) bei 5,38 ppm ($J = 6,8$ Hz; H-C(1)) und 2,49 ppm ($J = 6,8$ Hz; H-C(9)), ferner das Singulett der Methylgruppe bei 1,98 ppm. Im IR.-Spektrum von V (CHCl_3) treten Banden bei 1757 cm^{-1} (CH_3COO) und für eine freie OH-Gruppe bei 3497 cm^{-1} auf, was ebenfalls durch das NMR.-Spektrum von V (CDCl_3) bestätigt wird. Die vier CH_3COO -Signale erscheinen bei 2,00–2,06 ppm, das Singulett für die freie OH-Gruppe bei 3,64 ppm (verschwindet mit D_2O).

Von den 9 Sauerstoffatomen von Galiridosid können 6 der Glucose zugeordnet werden und 1 dem Dihydropyran-Ring. Ein weiteres Sauerstoffatom gehört einer OH-Gruppe im Aglucon an, was aus dem IR.- und NMR.-Spektrum von III hervorgeht. Das neunte O-Atom ist einem Epoxid-Ring zuzuordnen, denn II gibt die spezifische Epoxid-Reaktion mit Natriumthiosulfat (vgl. Catalposid [11]).

Der Epoxid-Ring lässt sich alkalisch – beim Galiridosid besonders gut mit Bariumhydroxid – spalten. Das dabei erhaltene amorphe Desepoxy-dihydroxygaliridosid (VI) sowie dessen kristallines Acetylderivat VII zeigen im UV.-Spektrum noch die charakteristische Bande für die Enol-Äther-Gruppierung, ebenso im IR.-Spektrum die Bande für die C(3)=C(4)-Doppelbindung bei 1657 cm^{-1} (VI, (KBr)) bzw. 1652 cm^{-1} (VII, (CHCl_3)). Da VI stark hygroskopisch war, wurde zur Elementaranalyse das Acetylderivat von VI verwendet.

In den NMR.-Spektren von VI und VII (vgl. Tabelle und Fig. 2–3) ist das Signal der Methylgruppe von 2,01 ppm in II bzw. 1,50 ppm in III nach höherem Feld (1,58 ppm bzw. 1,14 ppm) verschoben, was bestätigt, dass die Umwandlung von II \rightarrow VI das C(8) berührt. Ferner sinkt die Kopplungskonstante zwischen den Protonen am C(1) bei 6,11 bzw. 5,57 ppm und C(9) bei 2,88 bzw. 2,67 ppm von 6,2 bzw. 6,6 Hz auf Werte unter 1, wie bei den entsprechenden Abbauprodukten von Antirrinisid (I), deren Struktur der des Harpagids (VIII) ähnlich ist [6].

Im Gegensatz zu IV und V sind bei VI und VII die Vinylprotonen bei 6,74 bzw. 6,11 ppm ($J = 6,6$ bzw. 6,2 Hz; H-C(3)) und 5,66 ppm ($J = 6,6$ Hz) bzw. zwischen 4,75–5,37 ppm (H-C(4)) noch vorhanden. Das Proton an C(7), welches den X-Teil eines ABX -Systems ($-\overset{\text{C}}{\underset{|}{\text{C}}}(7)\text{H}-\overset{\text{C}}{\text{C}}(6)\text{H}_2-$) darstellt, erscheint bei VI als Doppeldublett bei 4,68 ppm ($J_{AX} = 8,6$ Hz; $J_{BX} = 11,0$ Hz). Die Signale des A- und des B-Teiles

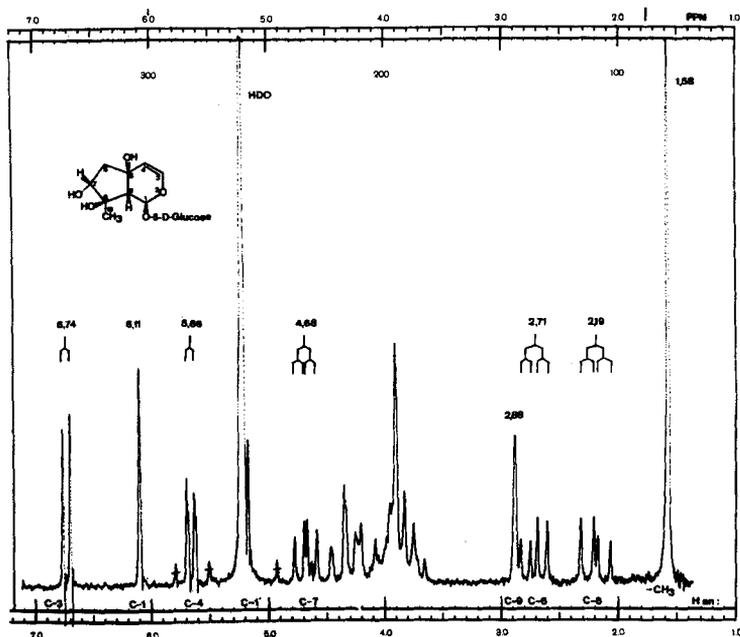


Fig. 2. NMR.-Spektrum (D₂O) von Deseoxy-dihydroxy-galiridosid (VI)

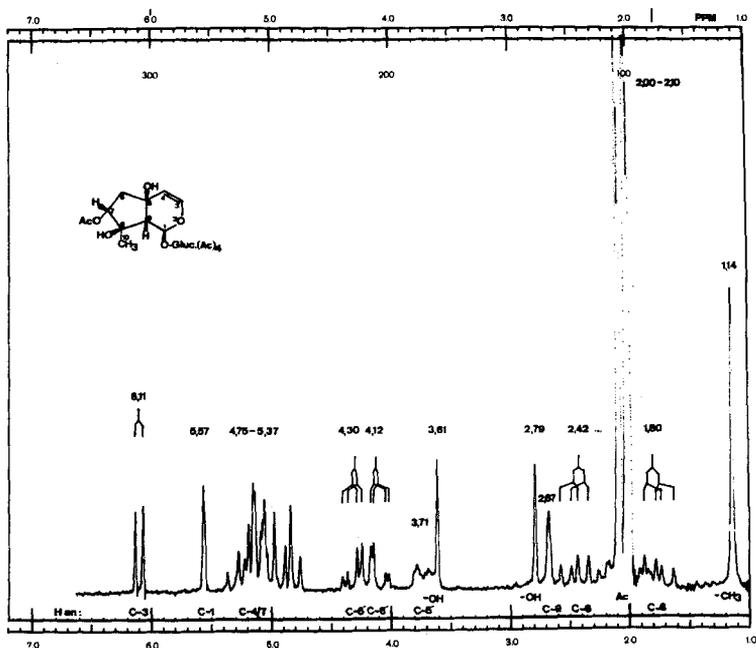


Fig. 3. NMR.-Spektrum (CDCl₃) von Penta-O-acetyl-deseoxy-dihydroxy-galiridosid (VII)

($-C(6)H_2-$) treten bei hohen Feldstärken als Doppeldublette bei 2,71 ppm ($J_{AB} = 14,4$ Hz; $J_{AX} = 8,6$ Hz) und bei 2,19 ppm ($J_{AB} = 14,4$ Hz; $J_{BX} = 11,0$ Hz) auf. Die entsprechenden Signale bei VII erscheinen zwischen 4,75–5,37 ppm (H-C(7)) (von den Glucoseprotonen überlagert) und ebenfalls als Doppeldublette ($-C(6)H_2-$) mit Schwerpunkt bei 2,42 ppm ($J_{AB} = 14,2$ Hz; $J_{AX} = 8,8$ Hz) und bei 1,80 ppm ($J_{AB} = 14,2$ Hz; $J_{BX} = 9,8$ Hz). Die Zuordnung wurde durch Entkoppelungsexperimente bewiesen.

Wie schon beim Tetra-O-acetyl-galiridosid (III) sowie beim Tetra-O-acetyldihydrogaliridosid (V) treten auch bei VII im IR.-Spektrum ($CHCl_3$) Banden bei 1750 cm^{-1} (CH_3COO) und bei 3525 cm^{-1} (OH) auf, Gruppen, deren Anwesenheit durch das NMR.-Spektrum ($CDCl_3$) bestätigt wird. Die Signale der Acetylgruppen erscheinen bei 2,00–2,10 ppm. VII hat im Gegensatz zu V zwei Singulette für freie OH-Gruppen bei 2,79 ppm (OH an C(8)) und 3,61 ppm (OH an C(5)) (verschwinden mit D_2O).

Dass die tertiäre OH-Gruppe an C(8) nicht acetyliert wurde, geht auch aus den NMR.-Spektren hervor. Bei der Überführung VI \rightarrow VII bleibt das Signal der CH_3 -Gruppe, welche sich in geminaler Stellung zum OH befindet, bei etwa gleicher Resonanzlage⁴). Wäre die OH-Gruppe acetyliert worden, müsste das Signal der CH_3 -Gruppe nach tieferem Feld verschoben worden sein. Das trifft zu beim Proton an C(7), welches nach tieferem Feld verschoben wurde, was durch die Acetylgruppe in geminaler Stellung hervorgerufen worden ist.

Während sowohl bei der sauren als auch bei der enzymatischen Hydrolyse von Galiridosid das Aglucon nicht gefasst werden kann, gelingt das bei der Hydrolyse von Dihydrogaliridosid (IV) mit Emulsin. Da das Aglucon (IX) nicht kristallisierte und schon nach einigen Tagen im Dünnschichtchromatogramm Spuren von Zersetzungsprodukten aufwies, wurde es zum Mono-O-acetylderivat X acetyliert, das aber ebenfalls nicht kristallisierte. Seine IR.- und NMR.-Spektren sind wenig informativ; immerhin zeigt die Kopplungskonstante $J_{1,9}$ von 8,4 Hz, dass die β -Orientierung bei X an C(1) nach Abspaltung der Glucose unverändert erhalten geblieben ist. Im Massenspektrum von X erscheint erstmals der Molekelpik M^+ bei m/e 228.

Die beiden Ringe sind im Galiridosid *cis* verknüpft, was aus folgenden Experimenten hervorgeht:

Bei der Reduktion von II mit Lithium in flüssigem Ammoniak entstanden neben zwei Hauptprodukten⁵) kleine Mengen von Bis-desoxy-aucubin (XI), welches als Acetat XII isoliert und durch Vergleich mit authentischem Acetyl-bis-desoxy-aucubin (durch Reduktion von Aucubin⁶) in derselben Weise [12] erhalten) identifiziert wurde.

Der Abbau zum Tetra-O-acetyl-bis-desoxy-aucubin (XII) konnte auch bei Catalposid [13], Melittosid [14] und Antirrinosid [6] durchgeführt werden. Die Ausbeute an XII von etwa 0,5% entspricht derjenigen bei der analogen Reaktion von Antirrinosid (vgl. [6]). Die Überführung von II in das Aucubinderivat bestätigt die Iridoidnatur von II (C(1), C(2), C(3) und C(4)) und beweist so die *cis*-Verknüpfung der beiden Ringe sowie die absolute Stereochemie der Asymmetriezentren an C(1), C(5) und C(9). Die *trans*-Anordnung der H-Atome an C(1) und C(9) geht zudem aus den

⁴) Unter Berücksichtigung der verschiedenen Vergleichssubstanz (externes Tetramethylsilan bei VI und internes Tetramethylsilan bei VII), was etwa 0,45–0,5 ppm ausmacht.

⁵) Bis jetzt noch nicht aufgearbeitet.

⁶) Für die Überlassung von Aucubin sei an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. H. Schmid, Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich, herzlich gedankt.

NMR.-Spektren von II, III und IV hervor ($J_{1,9} = 6,2\text{--}6,8$ Hz). Die Kopplungskonstante $J_{1,9}$ bewegt sich bei den anderen Iridoiden mit gleicher Anordnung je nach Verbindung zwischen 4–10 Hz (vgl. [15]).

Die vorgeschlagene Anordnung des Epoxid-Ringes stimmt mit der Struktur derjenigen Iridoidglucoside überein, welche eine Epoxid-Gruppe aufweisen und am C(8) substituiert sind (vgl. [10]); sie entspricht auch der Interpretation der NMR.-Spektren, ebenso wie den theoretisch zu erwartenden Verhältnissen bei der alkalischen Hydrolyse eines Epoxid-Ringes, wobei der Angriff des OH^- am weniger substituierten Kohlenstoff (C(7)) in α -Stellung unter Bildung eines *trans*-Glykols erfolgt).

Untersuchungen über die weiteren Iridoidglucoside von *Galeopsis tetrahit* L. sind im Gange.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeine Angaben.* Wenn keine besonderen Angaben vermerkt sind, wurden die Substanzen 15–25 Std. bei 0,01 Torr und Zimmertemperatur über P_2O_5 getrocknet. Die Smp. wurden mit einer *Mettler* Schmelzpunktapparatur FP21 bestimmt. Die UV.-Spektren wurden mit einem *Zeiss* Spektralphotometer PMQ II, die IR.-Spektren mit einem *Perkin-Elmer* IR.-Spektrophotometer Modell 257 aufgenommen. Die opt. Drehung wurde mit einem photoelektrischen Präzisionspolarimeter *Zeiss* bestimmt. Die NMR.-Spektren wurden mit einem *Varian*-Spektrographen, Modell HA100, bei 100 MHz gemessen. – Für die Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel HF_{254} *Merck*, für die Säulenchromatographie Kieselgel *Merck*, Korngrösse 0,05–0,2 mm und zu Filtrationszwecken Aluminiumoxid *Woelm* (Akt.-Stufe I, zur Chromatographie) verwendet. Zur Entwicklung von Chromatogrammen diente das *Godin*-Reagens [16] (1-proz. Vanillin-Lösung in Äthanol und 3-proz. Perchlorsäure in Wasser; je 1 Vol. mischen vor Gebrauch; einige Min. auf 85° erhitzen) und das Schwefelsäure-Reagens (10-proz. Schwefelsäure konz. in Äthanol; 5–10 Min. auf 110° erhitzen). Zum Nachweis von Glucose diente das Anilinphtalat-Reagens [17] (1,66 g Phthalsäure + 0,93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem *n*-Butanol; längeres Erhitzen bei 100°).

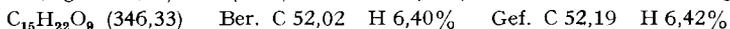
Abkürzungen: Ac = CH_3CO , Ae = Diäthyläther, An = Aceton, Alk = Alkohol, Be = Benzol, Bu = *n*-Butanol, DC. = Dünnschichtchromatogramm, dünn-schichtchromatographisch, Eg = Essigester, Fr. = Fraktion(en), i. V. = unter vermindertem Druck im Rotationsverdampfer, Pn = Pentan, Py = Pyridin, SC. = Säulenchromatographie, W = Wasser.

2. *Extraktion von Galeopsis tetrahit* L. 1 kg frische Blätter (Sammeldatum: 28. August 1968, blühende Pflanzen) von *Galeopsis tetrahit* L. wurden portionenweise im Mixer zerkleinert und sofort mit siedendem Alk 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde abgesaugt und der Rückstand ein zweites Mal gleich behandelt. Die vereinigten Auszüge wurden i. V. eingedampft und der Rückstand unter kräftigem Schütteln in W aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde durch Abnutschen und nachfolgender Filtration durch ein Faltenfilter vor Chlorophyll getrennt. Das trübe, dunkelbraune Filtrat wurde von Phenolen, Gerbstoffen und Flavonoiden durch Filtration durch eine Al_2O_3 -Säule (300 g) (Verfahren, wie es für Theviridosid [18] angewandt wurde) befreit. Es wurde mit W nachgewaschen, bis die Reaktion nach *Trim & Hill* [4] negativ ausfiel. Durch Einengen des Filtrates erhielt man eine braune, klare, stark viskose Lösung, die nach mehrmaligem Abdampfen mit CH_3OH -Be (1:1) und Trocknen im Hochvakuum 41,8 g hellbraunes Pulver ergab, das im DC. (System: Bu-AcOH-W (4:1:2), *Godin*-Reagens) zwei Hauptkomponenten, Galiridosid mit Rf 0,41 (violett) und eine Substanz mit Rf 0,51 (rot, Farbe verblasst rasch) neben einigen weiteren Flecken von geringerer Intensität (sehr wahrscheinlich auch Iridoidglucoside) aufwies.

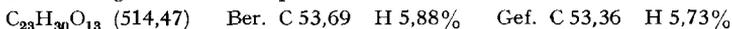
Eine Lösung von 40 g Trockenextrakt in 100 ml W wurde 22 Tage in einer *Kutscher-Steudel*-Apparatur mit 400 ml Eg, die alle 24 Std. ersetzt wurden, extrahiert. Die getrockneten Abdampfungsrückstände dieser Extrakte ergaben 17,1 g hellgelben Trockenextrakt, der die Gesamtmenge der zwei Hauptkomponenten enthält.

3. *Isolierung von Galiridosid.* Eine methanolische Lösung 15,55 g des obigen Trockenextraktes wurde mit 50 g Kieselgel (SC.) bis zur Bildung eines trockenen Pulvers geschüttelt, das auf eine Kieselgelsäule (300 g) gebracht wurde. Durch Elution mit Eg (1000 ml), Eg-An (9:1) (500 ml), Eg-An (1:1) (1000 ml), An (3000 ml), CH_3OH (1000 ml) wurden 680 Fr. zu 9 ml erhalten. Die

Fr. 366–430 lieferten 5,05 g weisses, amorphes Pulver, das das Galiridosid und die Substanz mit Rf 0,51 enthält. Diese 5,05 g, in 15 ml Bu-CH₃OH (70:5:20) gelöst, wurden auf eine Säule von 150 g Kieselgel gebracht und mit dem gleichen Gemisch eluiert. Die Fraktionen, welche zur Hauptsache Galiridosid enthielten (DC.), wurden zusammengenommen, filtriert und i.V. konzentriert. Die dickflüssige Lösung wurde mehrmals mit CH₃OH-Be (1:1) abgedampft. Der so erhaltene farblose Lack wurde in wenig Me gelöst und mit 300 ml Eg versetzt. Beim Konzentrieren i.V. fielen 2,5 g feine Kristalle aus. Durch mehrmaliges Umlösen aus Alk und mehrmaliger Konzentrierung der Mutterlauge wurden nach 5 Std. Trocknen im Vakuum 2,238 g (ca. 0,25% der frischen Blätter) reines Galiridosid (II) in durchsichtigen Nadelbüscheln erhalten. Zur Aufnahme von Spektren und zur Ausführung von Analysen wurde II 15 Std. bei 0,01 Torr/85° über P₂O₅ getrocknet. Smp. 189,5–191,5° (Zers.). $[\alpha]_D^{23} = -77,9^\circ$ ($c = 0,99$; W); $[\alpha]_D^{23} = -77,3^\circ$ ($c = 1,11$; CH₃OH). UV. (W), λ_{max} : 189,5 nm ($\log \epsilon = 4,18$). IR. (KBr): 1663 cm⁻¹ (C=C). NMR. s. Tabelle und Fig. 1.

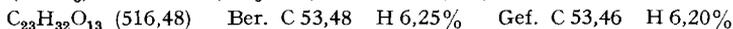


4. *Tetra-O-acetyl-galiridosid (III)*. 300 mg II wurden bei Zimmertemperatur mit 3 ml abs. Py + 3 ml Ac₂O 1 Stunde gerührt. Nach Abdampfen i.V. resultierten 503 mg III als DC.-einheitlicher, farbloser Lack. Im System CHCl₃-Be-CH₃OH (3:1:0,1), *Godin*-Reagens) wies Tetra-O-acetyl-galiridosid einen Rf-Wert von 0,40 auf (braun-violett). Durch Kristallisation aus CCl₄-Ac/Pn und Trocknen bei 0,01 Torr/85° über P₂O₅ während 15 Std. wurden 421 mg (94,3% d. Th.) durchsichtige Nadeln vom Smp. 131,2–132,0° erhalten. $[\alpha]_D^{23} = -60,0^\circ$ ($c = 1,05$; CHCl₃). UV. (W), λ_{max} : 192 nm ($\log \epsilon = 3,93$). IR. (CHCl₃): 1658 cm⁻¹ (C=C), 1755 cm⁻¹ (CH₃COO), 3525 cm⁻¹ (OH). NMR. (CDCl₃): 2,02–2,10 ppm (CH₃COO-); 3,18 ppm (OH) s; 3,75 ppm (H-C (5')) m; 4,23 ppm (H₂C (6')) m; NMR.-Signale der Gerüstprotonen s. Tabelle.



5. *Dihydrogaliridosid (IV)*. 500 mg II, in 20 ml 80-proz. Alk gelöst, wurden mit 175 mg 10-proz. Pd-Kohle bei Zimmertemperatur hydriert. Nach 30 Min. blieb die Reaktion stehen (Wasserstoffverbrauch entspr. 1 Mol-Äqu.). Nach Filtration, Abdampfen sowie einmaligem Eindampfen mit CH₃OH lag DC.-reines IV als weisser Schaum vor; Rf-Wert im System Bu-CH₃OH-W (70:5:20), *Godin*-Reagens) 0,24 (braun). Da die Substanz nicht kristallisierte, wurde sie vor der Aufnahme von Spektren in An + 5% W gelöst und durch eine Kieselgelsäule gelassen, die mit dem gleichen Gemisch eluiert wurde. Nach Eindampfen und Trocknen erhielt man 503 mg (100%) IV als sehr hygroskopischen Schaum. $[\alpha]_D^{24} = -76,7^\circ$ ($c = 1,06$; CH₃OH). NMR. s. Tabelle.

6. *Tetra-O-acetyl-dihydrogaliridosid (V)*. 120 mg Dihydrogaliridosid (IV) wurden mit 1 ml Py + 1 ml Ac₂O 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Abdampfen i.V. ergab der entstandene farblose Lack aus abs. Alk durchsichtige Nadeln, die durch Umkristallisieren aus Alk 151 mg (85,3%) V in Nadeln vom Smp. 146,8–147,3° lieferten. $[\alpha]_D^{24} = -57,9^\circ$ ($c = 1,12$; CHCl₃). IR. (CHCl₃): 1757 cm⁻¹ (CH₃COO), 3497 cm⁻¹ (OH).



7. *Epoxid-Nachweis mit Natriumthiosulfat*. 10,3 mg II wurde in einer Mischung von 2 ml An und 2 ml 0,1 N Natriumthiosulfatlösung gelöst, mit 1 Tropfen Phenolphthalein-Lösung versetzt und unter Rückfluss gekocht. Nach etwa 4 Min. färbte sich die Lösung rosarot (positive Reaktion). Nach einstündigem Kochen wurde durch DC.-Kontrolle (System: Bu-CH₃OH-W (70:5:20), Schwefelsäure-Reagens) der zu etwa 50% entstandene schwefelhaltige Ester mit einem Rf-Wert von 0,16 (grün) nachgewiesen.

8. *Hydrolyse von Galiridosid mit Bariumhydroxid*. Eine Lösung von 500,7 mg II wurde 6 Std. mit 2,5 g [Ba(OH)₂ · 8 H₂O] [6], gelöst in 15 ml W, bei 70–85° behandelt und dann unter Eiskühlung mit 1 N H₂SO₄ neutralisiert (Potentiometer). Das entstandene BaSO₄ wurde abzentrifugiert und mehrere Male mit W gewaschen. Die erhaltene schwach trübe Lösung wurde durch Kieselgur klar filtriert und i.V. eingedampft. DC. mit Bu-CH₃OH-W (70:5:20), *Godin*-Reagens) ergab als Hauptprodukt Desepoxy-dihydroxy-galiridosid (VI) mit Rf-Wert 0,25 (braun-violett) und neben Spuren von II zwei kaum erkennbare Verunreinigungen. Durch erneute SC. an 15 g Kieselgel mit Bu-CH₃OH-W (70:5:20) erhielt man aus den Hauptfr. durch Eindampfen und mehrmaliges Abdampfen mit CH₃OH-Be (1:1) nach Trocknen 423 mg (80,7%) VI als Schaum. Für die Aufnahme von Spektren wurde VI in W gelöst und die Lösung durch einen Millipore-Filter (MF-Millipore GSWP 0,22 μm) filtriert und gefriergetrocknet. $[\alpha]_D^{25} = -174,2^\circ$ ($c = 0,59$; CH₃OH). UV. (W), λ_{max} : 193,5 nm ($\log \epsilon = 3,89$). IR. (KBr): 1657 cm⁻¹ (C=C) NMR. s. Tabelle und Fig. 2.

9. *Penta-O-acetyl-desepoxy-dihydroxy-galiridosid (VII)*. Eine Lösung von 200 mg VI in 2 ml Py wurde mit 2 ml Ac_2O versetzt und nach zwei Std. Stehen bei Zimmertemperatur wie üblich aufgearbeitet. Das Rohprodukt kristallisierte aus Py. Die sorgfältig getrocknete Substanz wurde in Alk gelöst und zu einem Lack eingedampft. Nach Versetzen mit abs. Alk erhielt man 240 mg (71%) feine Nadeln, die, aus Alk umgelöst, Nadeln vom Smp. 189,5–190,5° (Zers.) ergaben. $[\alpha]_D^{25} = -82,8^\circ$ ($c = 1,11$; CHCl_3). UV. (W), $\lambda_{\text{max}} = 192 \text{ nm}$ ($\log \epsilon = 3,68$). IR. (CHCl_3): 1750 cm^{-1} (CH_3COO), 1652 cm^{-1} (C=C), 3525 cm^{-1} (OH). NMR. (CDCl_3): 2,00–2,10 ppm (CH_3COO); 2,79 ppm (OH an C(8)) s; 3,61 ppm (OH an C(5)) s; 3,71 ppm (H–C(5')) m; 4,12 ppm und 4,30 ppm (2H an C(6')) dd; NMR.-Signale der Gerüstprotonen s. Tabelle und Fig. 3.

$\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$ (574,52) Ber. C 52,26 H 5,92% Gef. C 52,21 H 5,50%

10. *Saure Hydrolyse von Galiridosid*. Eine Lösung von 21 mg II in 2 ml W wurde nach Zugabe von 2 ml 1N HCl $\frac{1}{2}$ Std. im siedenden Wasserbad erwärmt. Vom entstandenen schwarzen Polymerisat wurde abfiltriert. Das noch schwach bläuliche Filtrat wurde mit NaHCO_3 neutralisiert (Potentiometer) und konzentriert, wobei es sich schwach braun färbte. In dieser Lösung wurde Glucose durch DC. auf Gelman SG Schicht (Camag AG) (System: Eg-Py-W (8:2:1), Anilinphtalat-Reagens) nachgewiesen. Die Reaktion mit BM-Test Glucose⁷⁾ war stark positiv.

Zur Herstellung des Osazons wurde das konzentrierte Filtrat 30 Min. mit 50 mg *Carbo adsorbens* unter öfterem Schütteln stehengelassen, darauf durch Kieselgur filtriert und auf 2 ml eingedampft. Diese farblose Lösung wurde mit 2 ml einer frisch hergestellten Lösung von 1,0 g salzsaurem Phenylhydrazin in 10,0 ml 15-proz. Natriumacetatlösung versetzt und 1 Std. auf dem siedenden Wasserbad erwärmt. Das beim Erkalten in Nadeln auskristallisierte Osazon war nach Trocknung gemäss Smp. (207,2–207,6°), Misch-Smp., Rf-Wert und IR.-Spektrum mit Glucosazon identisch.

11. *Enzymatische Hydrolyse von Dihydrogaliridosid (IV)*. Eine Lösung von 15 mg reinem Emulsin (β -Glucosidase) in 2 ml Citrat-Puffer (pH 4,6) und 2,5 ml W wurde mit einer Lösung von 180 mg IV in 5 ml W versetzt. Nach 24 Std. Stehen wurde der Reihe nach mit Ae, CH_2Cl_2 und Be ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 und Abdampfen der organischen Lösungsmittel resultierte ein schwach gelblicher Lack, der sich im DC. (System: CHCl_3 - CH_3OH (20:1), *Godin*-Reagens) als ein schwach verunreinigtes Produkt erwies (Rf-Wert 0,33; braun). Es wurde an einer Kieselgelsäule unter Elution mit CHCl_3 - CH_3OH (20:1) gereinigt. Nach dem Eindampfen und Trocknen erhielt man 73,5 mg (76,4%) reines IX als farblosen, nicht kristallisierenden Lack.

12. *Acetylierung von IX*. 73,5 mg IX wurden mit 1 ml Py und 1 ml Ac_2O 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man ein Produkt im DC. (System: CHCl_3 - CH_3OH (20:1), *Godin*-Reagens) mit Rf-Wert 0,66 (braun), das von Spuren von Verunreinigungen durch SC. unter Elution mit CHCl_3 - CH_3OH (20:1) befreit wurde. Nach Trocknung resultierten 70 mg (77,5%) X als farbloser, nicht kristallisierender Lack. $M^+ = m/e$ 228 (ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_8$ 228). IR. (CHCl_3): 1762 cm^{-1} (CH_3COO), 3500 cm^{-1} (OH). NMR. (CDCl_3): 2,13 ppm (CH_3COO) s; 3,66 ppm (OH) s; NMR.-Signale der Gerüstprotonen s. Tabelle.

13. *Trimethylsilyläther von II*. Eine Lösung von 50 mg II in 1 ml abs. Py wurde mit einer Mischung von 1 ml Hexamethyldisilazan und 0,5 ml Trimethylchlorosilan versetzt (sofortige weisse Fällung), 30 Sek. kräftig geschüttelt und nach 30 Min. Stehen i.V. eingedampft. Nach mehrmaligem Nachdampfen mit CCl_4 wurde der entstandene Trimethylsilyläther aus dem Rückstand durch Schütteln mit CCl_4 extrahiert. Die vereinigten, filtrierten Auszüge ergaben nach dem Eindampfen und Trocknen 74 mg farblosen Lack, von dem ein NMR.-Spektrum (CCl_4) zur Bestimmung der Kopplungskonstante von H–C(1') der Glucose ($J = 7,0 \text{ Hz}$) aufgenommen wurde.

14. *Reduktion von Galiridosid mit Lithium-Ammoniak*. Eine Lösung von 400 mg II in 100 ml flüssigem Ammoniak und 3 ml abs. Alk wurde im Lauf von 2 Std. unter Rühren in regelmässigen Abständen mit insgesamt 500 mg Li versetzt. Nach 1 Std. Stehen wurden 15 g Ammoniumsulfat und in kleinen Portionen 25 ml Alk-W (2:1) zugegeben, wobei die blaue Farbe nach und nach verschwand. Nach dem Abdunsten des Ammoniaks wurde die Lösung durch Einleiten von CO_2 neutralisiert und abgedampft. Der Rückstand wurde mehrere Male mit heissem CH_3OH ausgeschüttelt und die methanolische Lösung kalt filtriert und eingedampft. Der erhaltene Lack wurde in Alk gelöst und wieder eingedampft, worauf 380 mg schwach hellgelber Schaum zurückblieben. Der Rück-

⁷⁾ BM-Test Glucose (Firma *Boehringer Mannheim GmbH*) ist ein Spezialindikatorpapier, das mit Glucoseoxydase und Peroxydase sowie mit einem Indikator imprägniert ist und spezifisch auf β -D-Glucose reagiert.

stand gab im DC. (System: $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ (75:25), Schwefelsäure-Reagens) 2 Hauptflecke mit Rf 0,27 (weinrot) und 0,45 (dunkel-violett), neben zwei sehr schwachen Flecken mit Rf 0,64 und 0,77. Die Substanz mit Rf 0,64 (violett-braun) entsprach dem Bisdesoxy-aucubin (XI). Die entstandenen Produkte wurden durch SC. an 12 g Kieselgel unter Elution mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ (10:90) (100 ml), $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ (20:80) (200 ml), CH_3OH (80 ml) getrennt. Die Fraktionen mit der Substanz Rf 0,64 ergaben nach Eindampfen und Trocknen 4,5 mg Rückstand. Dieser wurde mit 0,5 ml Py und 0,5 ml Ac_2O 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man einen schwach braunen Lack, der in $\text{CH}_3\text{OH-Ae}$ (2:8) gelöst und durch eine Säule von 200 mg Kieselgel (SC.) filtriert wurde. Nach Abdampfen und zweimaliger Kristallisation aus CH_3OH erhielt man 1,6 mg feine Nadeln vom Smp. 132,3–133,5°, die sich als Tetra-O-acetyl-bis-desoxy-aucubin (XII) erwiesen, von dem eine Vergleichsprobe aus Aucubin nach *Birch et al.* [12] hergestellt wurde.

Herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Schmid, Direktor des Org.-chemischen Institutes der Universität Zürich, für die Möglichkeit, im Org.-chemischen Institut verschiedene Einrichtungen benutzen zu können, ferner den Herren Prof. Dr. W. von Philipsborn und Dr. T. Winkler für die Aufnahme der NMR.-Spektren und für wertvolle Hinweise zur Interpretation einiger Spektren, den Herren Prof. Dr. M. Hesse und N. Bild für Massenspektren, Herrn H. Frohofer für IR.-Spektren und Analysen sowie Herrn J. Zsindely für viele anregende Diskussionen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] O. Sticher, *Tetrahedron Letters* 1970, 3197.
- [2] O. Sticher, Iridoidglucoside aus *Asperula odorata* L., *Galeopsis tetrahit* L. und *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum., Habilitationsschrift ETH Zürich, 1970.
- [3] J. H. Wieferring, *Phytochemistry* 5, 1053 (1966).
- [4] A. R. Trim & R. Hill, *Biochem. J.* 50, 310 (1952).
- [5] F. Adema, *Acta bot. neerl.* 17, 423 (1968).
- [6] M. L. Scarpati, M. Guiso & P. Esposito, *Gazz. chim. ital.* 98, 177 (1968).
- [7] K. Biemann, D. C. de Jongh & H. K. Schnoes, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 1763 (1963); I. A. Pearl & S. F. Darling, *Tetrahedron Letters* 1967, 1869; *Phytochemistry* 7, 831 (1968).
- [8] I. Souzu & H. Mitsuhashi, *Tetrahedron Letters* 1969, 2725.
- [9] O. Sticher & H. Schmid, *Helv.*, in Vorbereitung.
- [10] J. M. Bobbitt & K.-P. Segebarth, in A. R. Battersby & W. I. Taylor, «Cyclopentanoid Terpene Derivatives», Marcel Dekker, New York 1969.
- [11] J. M. Bobbitt, D. W. Spiggle, S. Mahboob, H. Schmid & W. von Philipsborn, *J. org. Chemistry* 31, 500 (1966) und darin zitierte Literatur.
- [12] A. J. Birch, J. Grimshaw & H. R. Juneja, *J. chem. Soc.* 1961, 5194.
- [13] W. H. Lunn, D. W. Edward & J. T. Edward, *Chemistry & Ind.* 1961, 1488; *Canad. J. Chemistry* 40, 104 (1962).
- [14] M. L. Scarpati & P. Esposito, *Gazz. chim. ital.* 97, 1209 (1967).
- [15] A. R. Battersby, R. S. Kapil & R. Southgate, *Chem. Commun.* 1968, 131; J. M. Bobbitt, D. W. Spiggle, S. Mahboob, W. von Philipsborn & H. Schmid, *Tetrahedron Letters* 1962, 321; J. M. Bobbitt, D. E. Kiely, A. Y.-w. Lam & E. I. Snyder, *J. org. Chemistry* 32, 1459 (1967); C. Djerassi, T. Nakano, A. N. James, L. H. Zalkow, E. J. Eisenbraun & J. N. Shoolery, *ibid.* 26, 1192 (1961); T. A. Geissman, W. F. Knaack jr. & J. O. Knight, *Tetrahedron Letters* 1966, 1245; M. Guiso & M. L. Scarpati, *Gazz. chim. ital.* 99, 800 (1969); H. Inouye, T. Arai & Y. Miyoshi, *Chem. pharmaceut. Bull.* 12, 888 (1964); H. Inouye, S. Ueda, M. Hirabayashi & N. Shimokawa, *Yakugaku Zasshi* 86, 943 (1966); H. Inouye, S. Inouye, N. Shimokawa & M. Okigawa, *Tetrahedron Letters* 1968, 683; I. Kitagawa, K. Hino, T. Nishimura, E. Mukai & I. Yosioaka, *Tetrahedron Letters* 1969, 3837; P. W. Le Quesne, *J. chem. Soc.* 1968, 1661; M. L. Scarpati & P. Esposito, *Gazz. chim. ital.* 97, 1209 (1967); *Ric. sci.* 37, 840 (1967); M. L. Scarpati, M. Guiso & P. Esposito, *Gazz. chim. ital.* 98, 177 (1968); P. W. Thies, *Tetrahedron* 24, 313 (1968); P. Tunnmann & H.-E. Hammer, *Liebigs Ann. Chem.* 712, 138 (1968).
- [16] P. Godin, *Nature* 174, 134 (1954); A. P. Mac Lennan, H. M. Randall & W. D. Smith, *Analyt. Chemistry* 31, 2020 (1959).
- [17] I. L. Bryson & T. J. Mitchell, *Nature* 167, 864 (1951).
- [18] O. Sticher, *Pharmaceut. Acta Helv.* 44, 453 (1969) und darin zitierte Literatur.