

179. Carotinoid-Glykoside

2. Mitteilung¹⁾

Untersuchungen zur Carotinoid-Zusammensetzung im Safran

von Hanspeter Pfander und Fritz Wittwer²⁾

Institut für organische Chemie der Universität Bern, Länggass-Strasse 7, 3012 Bern

(7. V. 75)

Zusammenfassung. In der vorliegenden Arbeit wurde der Äthanolextrakt (70proz.) von *Safran naturalis* untersucht und die drei Hauptprodukte isoliert. Die kristallisierten Verbindungen wurden in natürlich vorkommender und in peracetylierter Form mit Hilfe von UV./VIS., IR., NMR.- und Massen-Spektren charakterisiert. Der Zuckernachweis in den drei verseiften Komponenten erfolgte mittels Papier-, Dünnschicht- und Gas-Chromatographie. Bei den drei Verbindungen handelt es sich um Crocin = Crocetin-di-(β -D-gentiobiosyl)-ester (I), Crocetin-(β -D-gentiobiosyl)-(β -D-glucosyl)-ester (II) und Crocetin-di-(β -D-glucosyl)-ester (III). Die Vergleichsspektren der partialsynthetisierten, peracetylierten Derivate Crocetin-di-(2,3,4,8,9,10,12-hepta-O-acetyl- β -D-gentiobiosyl)-ester (IV) und Crocetin-di-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosyl)-ester (VI) bestätigen die Strukturen der gefundenen Verbindungen.

1. Einleitung. – Der Safranfarbstoff wurde erstmals im frühen 19. Jahrhundert durch *Aschoff* [2] chemisch untersucht, der das Pigment «Crocine» benannte. In einer Reihe von weiteren Arbeiten [3] wurde vor allem die Glykosidnatur des Crocins erkannt. In den Jahren 1927–33 gelang den Schülern von *Karrer* und *Kuhn* die Ermittlung der richtigen Konstitutionsformel des Crocins (I), als Di-gentiobiosyl-ester des Crocetins (8,8'-Diapo-carotin-8,8'-disäure) [4–7]. Im Verlaufe dieser Arbeiten wurde peracetyliertes Crocin partialsynthetisiert, während die Partialsynthese des natürlichen Crocins misslang. 1953 gelang *Inhoffen & Isler* [8] die erste Totalsynthese des Crocetin-dimethylesters.

Im Rahmen unserer Arbeiten über Carotinoidglykoside [1] waren wir an der Isolierung von Crocin interessiert, wobei es sich zeigt, dass der Safranfarbstoff kein einheitliches Pigment darstellt. In der vorliegenden Arbeit wird über die Struktur- aufklärung der wasserlöslichen Hauptkomponenten des Safranfarbstoffes berichtet.

2. Ergebnisse. – Der Äthanolextrakt des zuerst mit Äther erschöpfend ausgezogenen Safrans liess sich nach der Vortrennung auf der neuen Verteilungsapparatur nach *Signer* (vgl. [9]) dünn-schichtchromatographisch in acht Zonen trennen (Fig. 1).

Vorerst wurden die drei Hauptzonen 1, 5 und 8 isoliert, teilweise peracetyliert, und die Verbindungen spektroskopisch charakterisiert. Der Nachweis der Zuckerkomponente erfolgte nach der Hydrolyse durch Papier-, Dünnschicht- und Gas-Chromatographie. – Aus diesen drei Zonen konnten die im *Schema* dargestellten Verbindungen isoliert werden³⁾.

¹⁾ Erste Mitteilung, siehe [1].

²⁾ Teil der geplanten Dissertation von F. Wittwer, Universität Bern.

³⁾ Die Nummerierung des Aglykons erfolgte nach: Tentative Rules for the Nomenclature of Carotenoids (IUPAC Commission).

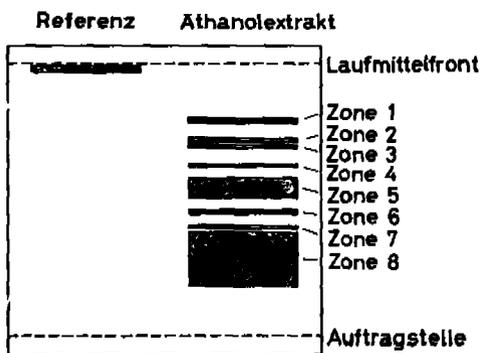
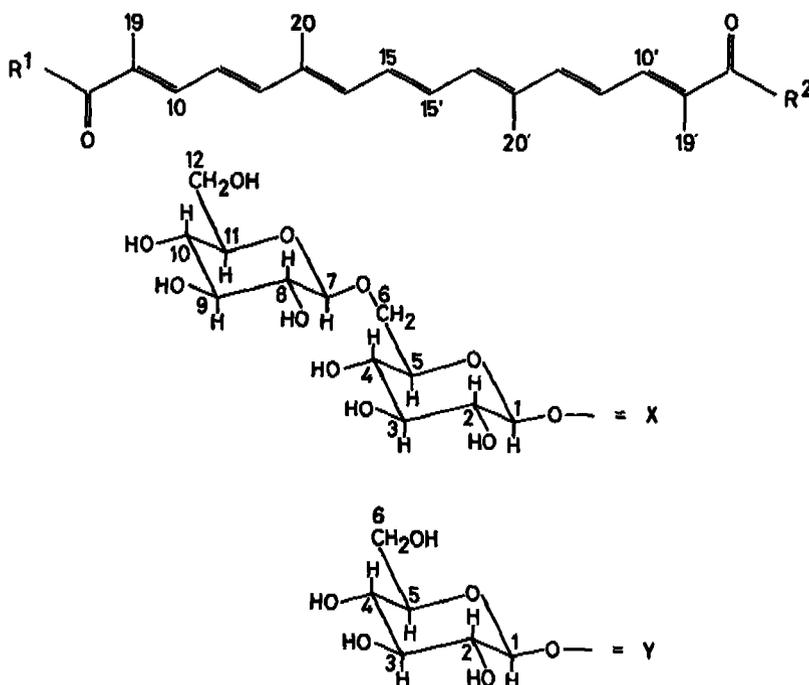


Fig. 1. *Dünnschichtchromatographische Auftrennung des Äthanolextraktes des Safran-Farbstoffes.* (Kieselgel-G Dünnschichtplatte imprägniert mit 0,23 M Natriumacetat, entwickelt im Laufmittel Äthylacetat/2-Propanol/Wasser 50:30:15; Referenz = Crocetin-diäthylester.)

Schema



Strukturen der isolierten Verbindungen

- Verbindung I: Crocetin-di-(β-D-gentiobiosyl)-ester = Crocin
- Verbindung II: Crocetin-(β-D-gentiobiosyl)-(β-D-glucosyl)-ester
- Verbindung III: Crocetin-di-(β-D-glucosyl)-ester

R ¹	R ²
X	X
X	Y
Y	Y

Crocin-di-(β -D-gentiobiosyl)-ester, Crocin (I). Die aus der Zone 8 isolierte Verbindung weist im Laufmittel Äthylacetat/2-Propanol/Wasser 50:30:15 einen Rf-Wert von ca. 0,25 auf. – Das Elektronenspektrum, gemessen in Pyridin, zeigt Maxima bei 421, 443 und 471 nm und stimmt mit demjenigen der Literatur [10] überein.

Das Spektrum der *peracetylierten Verbindung IV* (Fig. 2) weist in Chloroform Maxima bei 422, 443 und 472 nm auf und stimmt mit demjenigen der aus dem Crocin-di-silbersalz und Acetobromgentiobiose nach der Methode von *Kuhn* [7] partialsynthetisierten Verbindung gut überein.

Das Massenspektrum der peracetylierten Verbindung IV (Fig. 3), welches mit demjenigen des partialsynthetisierten peracetylierten Crocins identisch ist, bestätigt die vermutete Struktur durch das Auftreten des Molckel-Ions bei m/e 1564, sowie durch die Fragmente bei m/e 1217 ($M - 347$), 946 ($M - 619 + H$), 929 ($M - 635$), 886 ($M - 347 - 331$) und die entsprechenden Bruchstücke bei m/e 635, 619 und 331, welche durch die Abspaltung der Mono- resp. Disaccharideinheiten entstehen. Weitere Fragmentierungen können durch die Abspaltung von Essigsäure (z.B. m/e 1504 = $M - 60$), von Toluol, welches für Carotinoide charakteristisch ist (z.B. m/e 1412 = $M - 60 - 92$, Keten und CH_3CO^+ erklärt werden (näheres siehe exper. Teil).

Das in Fig. 4 gezeigte NMR.-Spektrum der peracetylierten Verbindung IV unterstützt die vermutete Struktur. Die für das Carotinoid charakteristischen Signale [11] sind bei 7,33 ppm (2 H, Protonen am C(10) resp. C(10')) und zwischen 6,25 und 6,9 ppm (8 H, übrige olefinische Protonen) zu erkennen. Die Signale zwischen 3,4 und 5,85 ppm können den Protonen der Gentiobiose zugeordnet werden, das Dublett bei 5,75 ppm (2 H) dem Proton am anomeren C(1) der Gentiobiose, wobei die Kopplungskonstante von $J \sim 8$ Hz auf die β -D-Konfiguration hinweist (siehe exper. Teil). Die Methylprotonen der Acetoxygruppen und der Polyenkette (C(19), C(20), C(19') und C(20')) sind zwischen 1,93 und 2,09 ppm (54 H) zu beobachten. Das im CDCl_3 enthaltene H_2O erzeugt ein Signal bei 1,65 ppm, während die Signale zwischen 1,2 und 1,6 ppm Verunreinigungen zuzuschreiben sind und im Spektrum der partialsynthetisch dar-

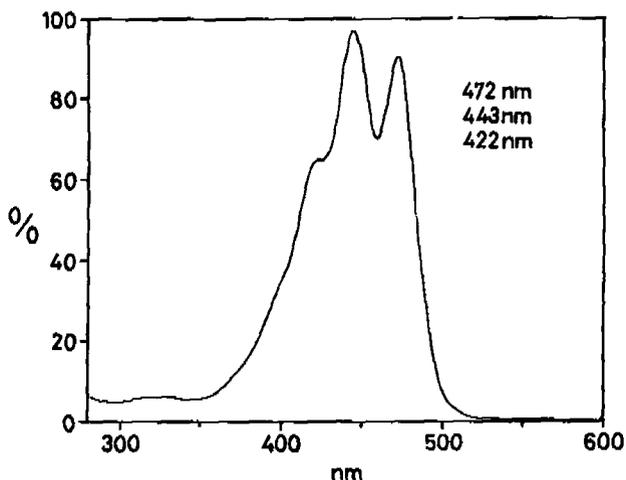


Fig. 2. Elektronenspektrum (in CHCl_3) des peracetylierten Crocins (IV)

gestellten Verbindung, welches in übrigen mit demjenigen der isolierten Verbindung identisch ist, schwächer auftreten. Im NMR.-Spektrum der nicht acetylierten Verbindung I sind die analogen Signale zu beobachten (siehe exper. Teil).

Das in KBr aufgenommene IR.-Spektrum (Fig. 5 und exper. Teil) der acetylierten Verbindung IV steht mit der angegebenen Struktur in bestem Einklang.

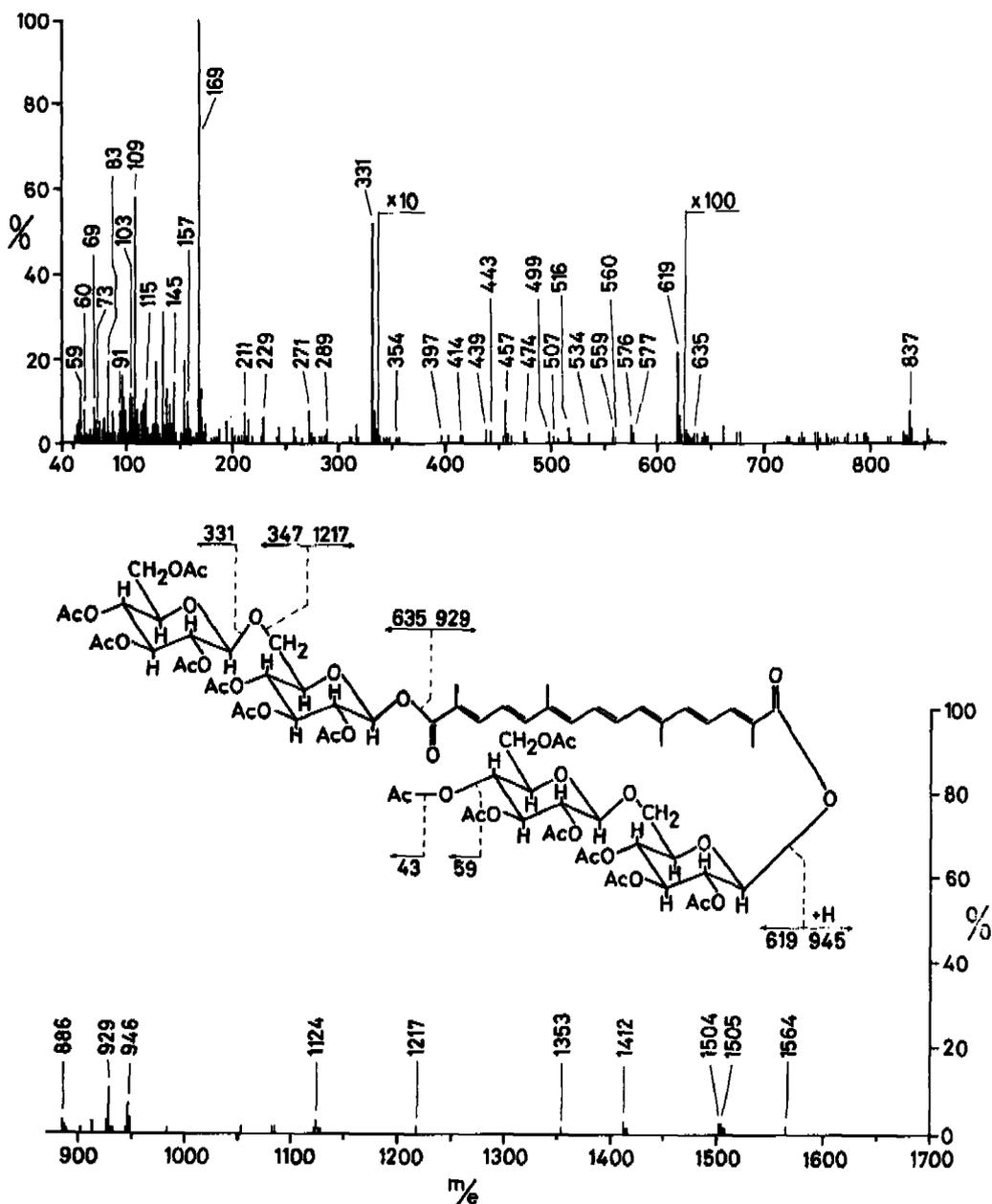


Fig. 3. Massenspektrum des peracetylierten Crocins (IV)

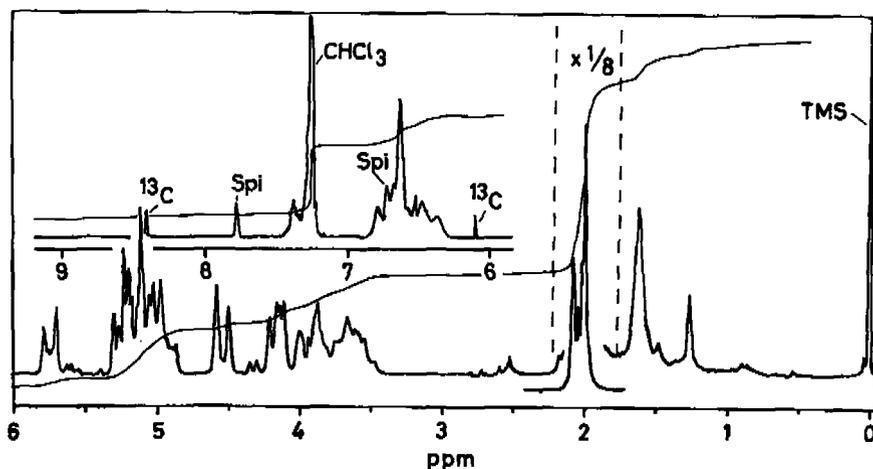


Fig. 4. NMR.-Spektrum (in CDCl_3) des peracetylierten Crocins (IV)

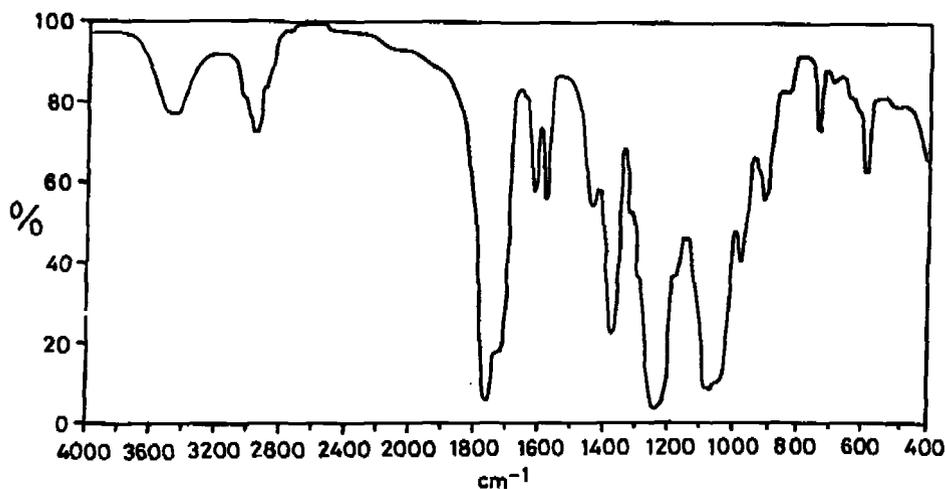


Fig. 5. IR.-Spektrum (in KBr) des peracetylierten Crocins (IV)

Während sich das IR.-Spektrum der partialsynthetischen Verbindung als identisch erweist, zeigt das Spektrum der nicht acetylierten Verbindung I gleiche Lage der Signale, jedoch fehlen die intensiven Acetatbanden.

Zum Nachweis der Zuckerkomponente wurde die Verbindung I in ammoniakalischem Äthanol hydrolysiert. Sowohl papier- und dünn-schicht-chromatographisch als auch gas-chromatographisch (als Silylderivat) liess sich einzig Gentiobiose nachweisen. Somit kommt der aus Zone 8 isolierten Verbindung I, welche mengenmässig das Hauptcarotinoid im Safran darstellt, die Struktur des *Crocetin-di-(β -D-gentiobiosyl)-esters* zu, wie dies bereits von Kuhn [5] und Karrer [6] postuliert wurde.

Crocetin-(β -D-gentiobiosyl)-(β -D-glucosyl)-ester (II). Die aus Zone 5 isolierte Verbindung weist im Laufmittel Äthylacetat/2-Propanol/Wasser 50:30:15 einen Rf-Wert

von ca. 0,5 auf. – Sowohl das Elektronenspektrum von II als auch das von der peracetylierten Verbindung V sind mit den entsprechenden Spektren des Crocins in Bezug auf die Lage der Maxima und des Habitus identisch; ebenso sind die IR.-Spektren im wesentlichen analog.

Einen Hinweis auf die Struktur der Verbindung gibt das Massenspektrum der peracetylierten Verbindung V (Fig. 6) mit einem Molekel-Ion bei m/e 1276, was auf eine

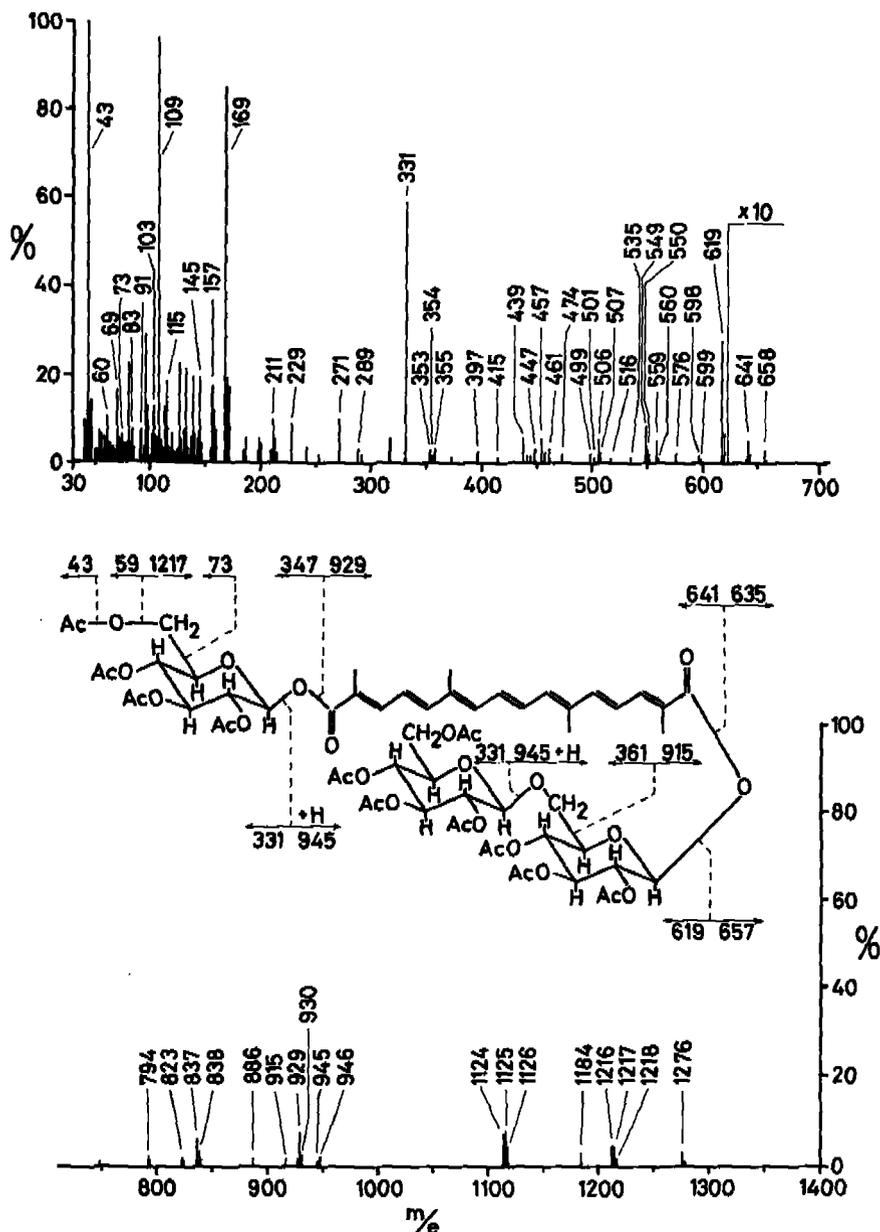


Fig. 6. Massenspektrum von Verbindung V (= peracetyliertes II)

Verbindung mit drei Monosaccharid-Einheiten hinweist. Im Spektrum treten wie bei Verbindung IV, durch Abspaltung der Mono- und Disaccharide, Fragmente bei m/e 946 ($M - 331 + H$), 945 ($M - 331$), 930 ($M - 347 + H$), 929 ($M - 347$), 915 ($M - 361$), 658 ($M - 619 + H$), 642 ($M - 635 + H$), 641 ($M - 635$) und bei m/e 619 und 331 auf. Daneben treten typische Carotinoidfragmentierungen (Abspaltung von Toluol) und, wie bei der Verbindung IV, die Abspaltung von Essigsäure, Keten und CH_3CO^+ auf.

Das NMR.-Spektrum der isolierten Verbindung und des *Peracetylderivates V* (Fig. 7) sind in Bezug auf die Signallage mit denen der Verbindungen I und IV identisch. Charakteristische Unterschiede sind jedoch im Integral zu beobachten. So beträgt das Integral des Multipletts zwischen 4,85 und 5,33 ppm lediglich 9 H, das Dublett bei 4,55 ppm (Proton am C(7) der Gentiobiose) entspricht *einem* Proton und das Multiplett zwischen 1,93 und 2,15 ppm (Methylprotonen der Acetoxygruppen und Ketten-Methylgruppen) 45 H, was mit der postulierten Struktur übereinstimmt.

Nach erfolgter Hydrolyse konnten chromatographisch D-Glucose und D-Gentiobiose als Zuckerkomponenten nachgewiesen werden, wobei die gas-chromatographische Untersuchung ein Verhältnis von ungefähr 1:1 ergab. Bei der isolierten Verbindung II handelt es sich somit um einen gemischten Zuckerester des Crocetins, den *Crocetin-(β -D-gentiobiosyl)-(β -D-glucosyl)-ester*.

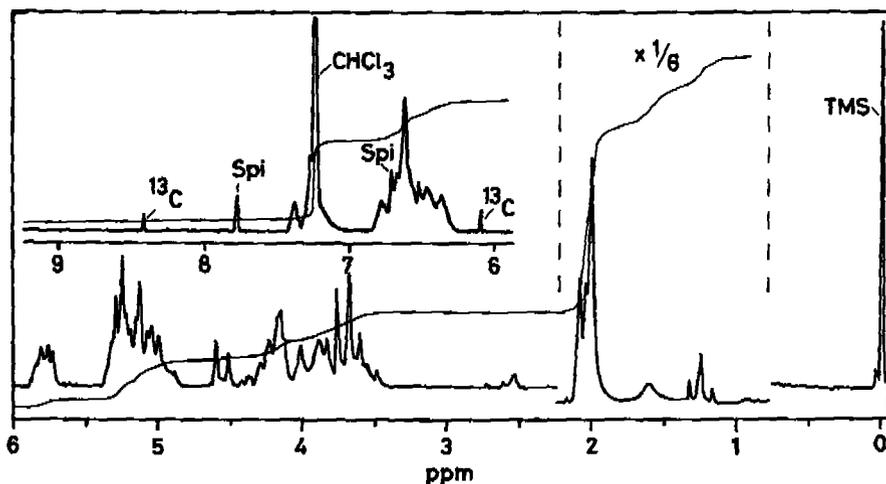


Fig. 7. NMR.-Spektrum (in $CDCl_3$) von Verbindung V (= peracetyliertes II)

Crocetin-di-(β -D-glucosyl)-ester (III). Der R_f -Wert dieser Verbindung beträgt im Laufmittel Äthylacetat/2-Propanol/Wasser 50:30:15 ca. 0.8. - Die Elektronenspektren der Verbindung III, des Peracetylderivates VI und der partialsynthetisch dargestellten Peracetylverbindung sind mit den Spektren der vorgängig beschriebenen Verbindungen identisch. Ebenso sind die IR.-Spektren im wesentlichen sehr ähnlich.

Das Massenspektrum der Verbindung VI (Fig. 8) zeigt ein Molekel-Ion bei m/e 988, was einem Diester von Crocetin mit zwei Hexoseeinheiten entspricht. Die Fragmente bei m/e 658 ($M - 331 + H$), 642 ($M - 347 + H$), sowie bei m/e 331, und die Abwesenheit der für Disaccharide charakteristischen Fragmentierung bestätigen die vor-

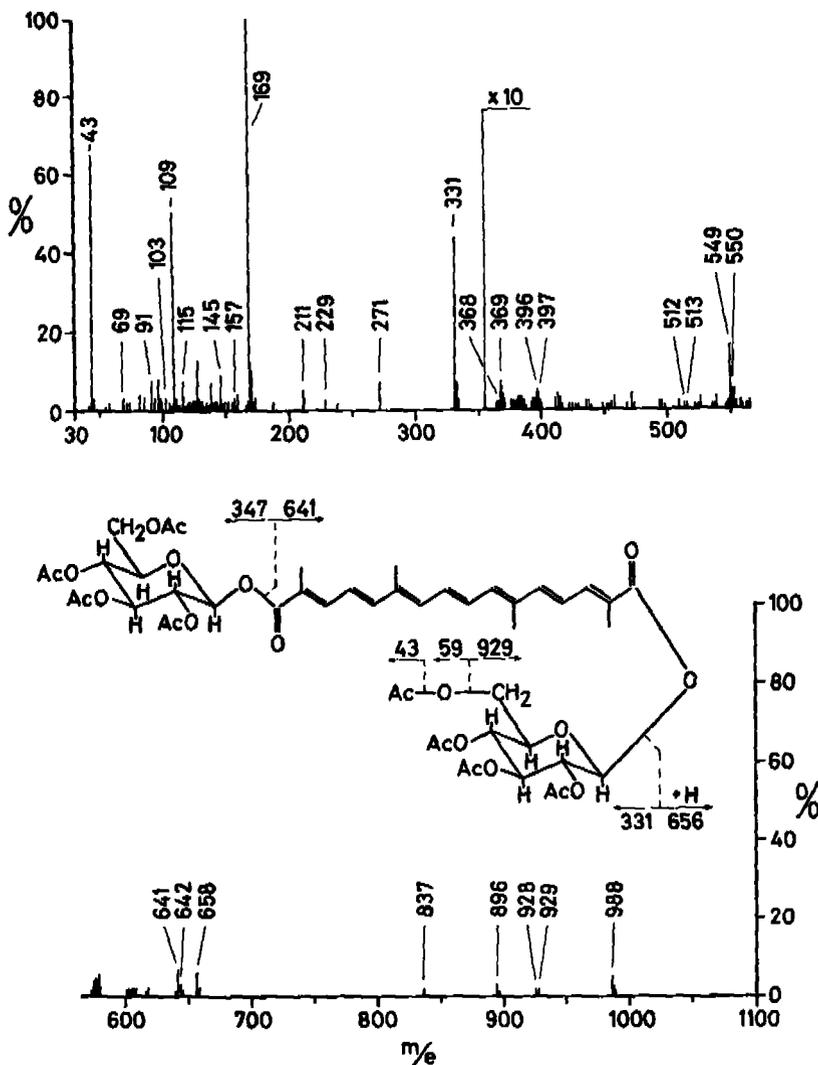


Fig. 8. Massenspektrum von Verbindung VI (= peracetyliertes III)

geschlagene Struktur. Die übrigen Fragmentierungen können analog denen der vorgängig beschriebenen Verbindungen erklärt werden.

Die NMR.-Spektren der Verbindungen III und VI (Fig. 9) stehen in Einklang mit der postulierten Struktur. So fehlt das Dublett bei 4,53 ppm (Proton am C(7) des Disaccharides), das Integral zeigt 6 H für das Multipllett zwischen 4,9 und 5,36 ppm (Protonen an C(2)-C(4)), während das Multipllett zwischen 1,82 und 2,11 ppm 36 Protonen entspricht. Das Signal bei 3,65 ppm dürfte auf eine Verunreinigung zurückzuführen sein und fehlt bei der partialsynthetisierten Peracetylverbindung.

Mit den drei angewendeten chromatographischen Methoden konnte nach der Hydrolyse als einziges Kohlenhydrat Glucose nachgewiesen werden. Somit handelt es sich bei dieser Verbindung um *Crocelin-di-(β -D-glucosyl)-ester* (III).

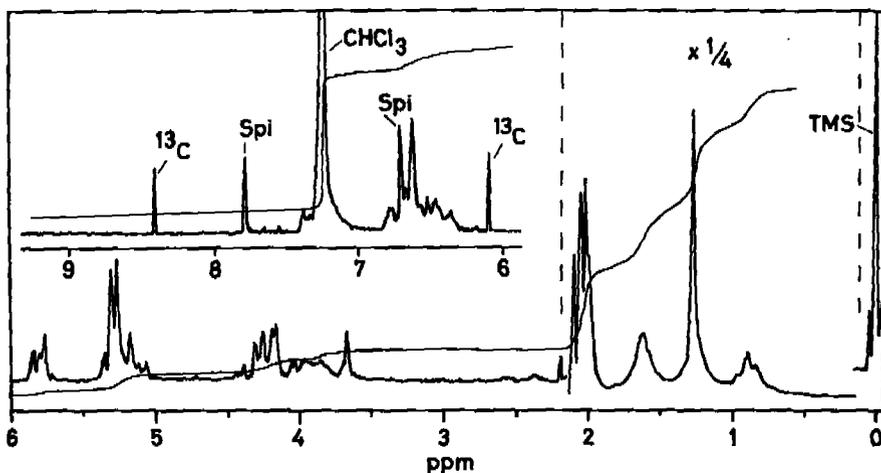


Fig. 9. NMR.-Spektrum (in CDCl_3) von Verbindung VI (= peracetyliertes III)

3. Diskussion. - *Karrer* und *Kuhn* isolierten aus dem Safran als einziges Carotinoid-Glycosid den Crocetin-di-(β -D-gentiobiosyl)-ester. Wir isolierten neben dem Crocin, welches mengenmässig den Hauptanteil der Carotinoide darstellt, auch den Diglycosylester und den gemischten Ester aus Glucose und Gentiobiose. Es stellt sich nun die Frage, ob die isolierten Produkte natürlich vorkommen, oder Artefakte darstellen.

Die Tatsache, dass in früheren Arbeiten die Glucosylester nicht gefunden wurden, ergibt keine weiteren Hinweise, da bei der Isolierung die Verbindung lediglich durch Umkristallisation gereinigt wurde, wobei Nebenprodukte verloren gehen können. Eine Bildung der Glucosederivate während der Aufarbeitung, durch Umesterung mit Glucose im Extrakt, glauben wir ausschliessen zu können, da die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Zonen von Beginn der Aufarbeitung - laufend kontrolliert - konstant blieb.

Es bleibt somit die Frage offen, ob diese gefundenen Verbindungen zwischen der Ernte und der Aufarbeitung während der Lagerung entstanden sind, oder ob es sich wirklich um Naturprodukte handelt.

Die Strukturermittlung der anderen isolierten Nebenprodukte, sowie die Untersuchung der Carotinoidzusammensetzung von frischem Safran und die Partialsynthese der isolierten Verbindungen sind zur Zeit im Gange.

Diese Arbeit wurde durch die Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG* (Basel) unterstützt. Besonderer Dank gilt den Herren *Dros. J. Chopard, G. Englert* und *W. Vetter*, sowie Herrn *W. Meister*, für die Aufnahme der IR.-, NMR.- resp. Massen-Spektren, und Herrn *Dr. H. Thommen* für seine wertvollen Anregungen.

4. Experimenteller Teil

Allgemeines. Die Extraktion und sämtliche Reaktionen wurden unter Argon- oder Stickstoff-Atmosphäre im Dunkeln ausgeführt.

Reagenzien. Crocetin-diäthylester wurde uns freundlicherweise von der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG* (Basel) zur Verfügung gestellt. Die α -Acetobromglucose (Nr. 00530) war das käufliche Produkt der *Fluka AG* (Schweiz). Das Gentiobiose-octaacetat (Nr. G 3125) wurde von

der Firma *Sigma, Chemical Company* (USA) bezogen. Die Herstellung der α -Acetobromgentiobiose erfolgte nach einer Vorschrift von *D. H. Brauns* [12].

Isolierung der Safran-Glykoside. - 20 g Safran (*Crocus naturalis pulvis, Siegfried & Co.* (Zofingen), Nr. 127622) wurden während 24 Std. mit 120 ml trockenem Äther extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Rückstand in 320 ml 70proz. Äthanol 46 Std. gerührt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die tief rot gefärbte, klare Lösung mit 320 ml abs. Äthanol versetzt und bei + 5° für 36 Std. stehengelassen, wobei sich an den Wänden des Gefässes grösstenteils ölige, leicht braun gefärbte Begleitsubstanzen niederschlugen. Aus der klaren Lösung konnten durch Eindampfen des Lösungsmittels 10,7 g Rohextrakt gewonnen werden.

Auf der neuen Verteilungsapparatur nach *Signer* (vgl. [9]) wurden 5 g des Äthanolextraktes im Phasenpaar *n*-Butanol/H₂O vortrennt. Die Probeneingabe erfolgte in der Butanolphase; die Rotationsgeschwindigkeit des Zylinders (30 Umdrehungen/Min.), sowie die Durchlaufgeschwindigkeit der beiden Phasen (5-36 ml/Std.) wurden gemäss der Beobachtung des Trennvorganges variiert. Durch diese Vortrennung konnte ein Teil der Hauptkomponente (*Crocin*) rein abgetrennt und direkt kristallisiert werden, während die übrigen Komponenten stark angereichert wurden und ein grosser Teil der farblosen Begleitsubstanzen abgetrennt werden konnte.

Die einzelnen Fraktionen wurden anschliessend durch 2malige Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennt (1. DC.: Kieselgel G nach *Stahl*, gepuffert mit 0,23 M Natriumacetat, Schichtdicke 0,2 mm; 2. DC.: Kieselgel H nach *Stahl*, Schichtdicke 0,2 mm; Laufmittel für beide Trennungen Äthylacetat/2-Propanol/H₂O 50:30:15). Die Kristallisation erfolgte aus 80proz. Äthanol.

Acetylierungen. Die kristallinen *Crocinderivate* wurden in trockenem Pyridin und Essigsäureanhydrid im Verhältnis 2:1 gelöst und 24 Std. stehengelassen. Anschliessend wurde mit *n*-Butanol/H₂O im Verhältnis 1:1 ausgeschüttelt, die Butanolphase mit ges. K₂CO₃-Lösung und 3mal mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Kristallisation erfolgte aus abs. Äthanol.

Spektroskopische Daten der Safran-Glykoside. -

Crocetin-di-(β -D-gentiobiosyl)-ester = Crocin (I). - UV./VIS. (Pyridin): 421, 443 und 471 nm. - NMR. ((CD₃)₂SO): 7,2-7,5 (2 H, Proton am C(10) resp. C(10') der Kette); 6,4-7,0 (8 H, übrige Protonen der Kette); 5,4 (2 H, Proton am C(1) der Gentiobiose, *J* ~ 8); 5,1 (-OH der Gentiobiose); 4,15 (2 H, Proton am C(7) der Gentiobiose, *J* ~ 8); 2,8-4,1 (übrige Zuckerprotonen + H₂O); 2,5 (DMSO), 1,97 (12 H, Ketten-Methylgruppen); 1,7 (nicht interpretierbar), 1,05-1,3 ppm (Äthanol und Paraffin). - IR.: 970 (-CH=CH- *trans*), 1077 (-C-O-C- Äther), 1230 (Ester -C-O-), 1578 und 1614 (-C=C- konj. Polyen), 1700 (konj. Ester -C=O), 2960 (aliph. C-H), 3408 cm⁻¹ (-OH und wenig Kristallwasser).

Crocetin-di-(2,3,4,8,9,10,12-hepta-O-acetyl- β -D-gentiobiosyl)-ester (IV). Sämtliche Spektren der partialsynthetisierten und der durch Peracetylierung der isolierten Verbindung erhaltenen Substanzen stimmen überein.

UV./VIS. (CHCl₃): 422, 443 und 472 nm. - MS.: Carotinoidfragmente bei *m/e* 1564 (*M*), 1505 (*M* - 59), 1504 (*M* - 60), 1412 (*M* - 92 - 60), 1353 (*M* - 92 - 60 - 59), 1217 (*M* - 347), 1124 (*M* - 92 - 348), 946 (*M* - 619 + H), 929 (*M* - 635), 886 (*M* - 619 - 59) oder (*M* - 347 - 331), 837 (*M* - 635 - 92), 109, 91, 83, 69 und 43. Eine Reihe von Fragmenten der peracetylierten Glucose wurden von *Bismann* [13] postuliert und in diesem Spektrum bei *m/e* 331, 289 (331 - 42), 271, 229, 211, 169 (100%), 157, 145, 119, 103, 73, 60, 59 und 43 gefunden. Eine entsprechende Fragmentierung könnte auch die Gentiobiose aufweisen, deren Spaltstücke bei *m/e* 635, 620, 619, 577 (619 - 42), 576 (619 - 43), 560 (619 - 59), 559 (619 - 60), 534 (619 - 43 - 42), 516 (619 - 60 - 43), 507 (635 - 43 - 43 - 42), 499 (619 - 60 - 60), 474 (619 - 59 - 43 - 43), 457 (619 - 60 - 60 - 42), 443 (620 - 59 - 59 - 59), 439 (619 - 60 - 60 - 60), 414 (635 - 60 - 59 - 59 - 43), 397 (619 - 60 - 60 - 59 - 43), 354 (619 - 60 - 60 - 59 - 43 - 43), 288 (619 - 331) und 272 (619 - 347) liegen. - NMR. (CDCl₃): 7,33 (2 H, H am C(10) resp. C(10') der Kette; CHCl₃); 6,25-6,9 (8 H, übrige olefinische Protonen); 5,75 (2 H, Proton am C(1) der Gentiobiose, *J* ~ 8); 4,53 (2 H, Proton am C(7) der Gentiobiose, *J* ~ 8); 4,83-5,33 (12 H, Protonen an C(2)-C(4) resp. C(8)-C(10) des Disaccharids); 3,95-4,53 (4 H, Protonen am C(12) des Zuckers); 3,43-3,93 (8 H, Zuckerprotonen an C(5), C(6) und C(11)); 1,93-2,09 (54 H, Methylprotonen der Acetoxygruppen und der Polyenkette); 1,65 (H₂O im CDCl₃); 1,2-1,6 ppm (Äthanol und Paraffin). - IR.: 984 (-CH=CH- *trans*), 1077 (-C-O-C- Äther),

1228 (Ester $-C-O-$), 1584 und 1616 ($-C=C-$ konj. Polyen), 1720 und 1759 (konj. und nicht konj. Ester $-C=O$), 2980 (aliph. CH) und 3440 cm^{-1} (wenig Kristallwasser).

Crocetin-(β -D-gentiobiosyl)-(β -D-glucosyl)-ester (II). - UV./VIS. (Pyridin): 421, 443 und 471 nm. - NMR. $(CD_3)_2SO$: 7,34 (2 H, H am C(10) resp. C(10') der Kette; $CHCl_3$); 6,4-7,0 (8 H, übrige Kettenprotonen); 5,4 (2 H, Proton am C(1) der Gentiobiase resp. Glucose, $J \sim 8$); 4,3-5,55 (H der Zucker-OH); 4,15 (1 H, H am C(7) der Gentiobiase, $J \sim 8$); 2,7-4,05 (restliche Zuckerprotonen + H_2O); 2,5 (DMSO); 1,97 (12 H, Ketten-Methylprotonen); 1,68 (nicht interpretierbar); 0,7-1,3 ppm (Äthanol und Paraffin). - IR.: 971 ($-CH=CH-$ trans), 1082 ($-C-O-C-$ Äther), 1233 und 1293 (Ester $-C-O-$), 1583 und 1615 ($-C=C-$ konj. Polyen), 1685 (konj. Ester $-C=O$), 2960 (aliph. CH), 3446 cm^{-1} ($-OH$ und wenig Kristallwasser).

Crocetin-(2,3,4,8,9,10,12-hepta-O-acetyl- β -D-gentiobiosyl)-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosyl)-ester (V). UV./VIS. ($CHCl_3$): 421, 443 und 472 nm. - MS.: Carotinoidfragmente bei m/e 1276 (M), 1217 (M - 59), 1216 (M - 60), 1184 (M - 92), 1125 (M - 92 - 59), 1124 (M - 92 - 60), 946 (M - 331 + H), 945 (M - 331), 930 (M - 347 + H), 929 (M - 347), 915 (M - 361), 886 (M - 331 - 59), 838 (M - 92 - 347 + H), 837 (M - 92 - 347), 823 (M - 92 - 361), 794 (M - 92 - 331 - 59), 658 (M - 619 + H), 642 (M - 635 + H), 641 (M - 635), 599 (M - 619 - 59 + H), 598 (M - 619 - 59), 549 (M - 92 - 635), 507 (M - 92 - 619 - 59 + H), 506 (M - 92 - 619 - 59), 461 (M - 635 - 60 - 60 - 60), 457 (M - 92 - 92 - 635), 109, 91, 83, 69, 43 (100%), sowie Zuckerfragmente bei m/e 619, 576 (619 - 43), 560 (619 - 59), 559 (619 - 60), 550 (635 - 43 - 42), 535 (619 - 42 - 42), 516 (619 - 60 - 43), 501 (619 - 59 - 59), 499 (619 - 60 - 60), 474 (619 - 59 - 43 - 43), 447 (619 - 43 - 43 - 43 - 43), 439 (619 - 60 - 60 - 60), 415 (635 - 59 - 59 - 59 - 43), 397 (619 - 60 - 60 - 59 - 43), 355 (619 - 60 - 59 - 59 - 43 - 43), 354 (619 - 60 - 60 - 59 - 43 - 43), 353 (619 - 60 - 60 - 60 - 43 - 43), 331, 289 (331 - 42), 271, 229, 211, 169, 157, 145, 115, 109, 103, 73, 60, 59 und 43 (100%). - NMR. $(CDCl_3)$: 7,33 (2 H, H am C(10) resp. C(10') der Kette; $CHCl_3$); 6,25-6,9 (8 H, restliche Kettenprotonen); 5,65-5,87 (2 H, H am C(1) von Gentiobiase resp. Glucose, $J \sim 8$); 4,85-5,33 (9 H, H an C(2)-C(4) von Gentiobiase und Glucose, sowie an C(8)-C(10) der Gentiobiase); 4,55 (1 H, H am C(7) des Disaccharids, $J \sim 8$); 3,95-4,45 (4 H, H am C(12) der Gentiobiase und C(6) der Glucose); 3,43-3,95 (5 H, H am C(5), C(6) und C(11) der Gentiobiase, sowie am C(5) der Glucose); 1,93-2,15 (45 H, Methylprotonen der Acetoxygruppen und H der Polyenkette); 1,6 (H_2O), 0,75-1,35 ppm (Äthanol und Paraffin). - IR.: 978 ($-CH=CH-$ trans), 1226 (Ester $-C-O-$), 1580 und 1614 ($-C=C-$ konj. Polyen), 1717 und 1760 (konj. und nicht konj. Ester $-C=O$), 2980 (aliph. CH), 3436 cm^{-1} (wenig Kristallwasser).

Crocetin-di-(β -D-glucosyl)-ester (III). - UV./VIS. (Pyridin): 421, 443 und 471 nm. - NMR. $((CD_3)_2SO)$: 7,7 ($CHCl_3$); 7,34 (2H, H am C(10) resp. C(10') der Kette); 6,4-7,0 (8H, übrige Kettenprotonen); 5,43 (2 H, Proton am C(1) der Glucose, $J \sim 8$); 4,85-5,43 (6 H, Protonen dreier OH-Gruppen der Glucose); 4,45-4,7 (2 H, Proton der restlichen OH-Gruppe am Monosaccharid); 2,9-3,65 (übrige Zuckerprotonen + H_2O); 2,5 (DMSO); 1,97 ppm (12 H, H der Ketten-Methylgruppen); 1,69 (nicht interpretierbar); 0,5-1,4 ppm (Äthanol und Paraffin). - IR.: 970 ($-CH=CH-$ trans), 1080 ($-C-O-C-$ Äther), 1233 (Ester $-C-O-$), 1580 und 1615 ($-C=C-$ konj. Polyen), 1678 und 1700 (konj. Ester $-C=O$), 2860 (aliph. CH), 3552 und 3452 cm^{-1} ($-OH$ und wenig Kristallwasser).

Crocetin-di-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosyl)-ester (VI). Bei VI stimmen die Spektren der partialsynthetisierten und der isolierten, peracetylierten Verbindung überein.

UV./VIS. ($CHCl_3$): 421, 444 und 472 nm. - MS.: Carotinoidfragmente bei m/e 988 (M), 929 (M - 59), 928 (M - 60), 896 (M - 92), 837 (M - 92 - 59), 658 (M - 331 + H), 642 (M - 347 + H), 641 (M - 347), 550 (M - 92 - 347 + H), 549 (M - 92 - 347), 513 (M - 347 - 43 - 43 - 42), 512 (M - 347 - 43 - 43 - 43), 413 (M - 92 - 92 - 331 - 60), 412 (M - 92 - 92 - 332 - 60), 397 (M - 92 - 92 - 347 - 60), 396 (M - 92 - 92 - 348 - 60), 369 (M - 92 - 347 - 60 - 60 - 60), 368 (M - 92 - 348 - 60 - 60 - 60), 91, 69 und 43; sowie Zuckerfragmente bei m/e 331, 271, 229, 211, 169 (100%), 157, 145, 115, 109, 103, 73, 60, 59 und 43. - NMR. $(CDCl_3)$: 7,25 (2 H, H am C(10) resp. C(10') der Kette); 6,3-6,84 (8 H, restliche Kettenprotonen); 5,75 (2 H, H am C(1) der Glucose, $J \sim 8$); 5,0-5,36 (6 H, Protonen an C(2)-C(4) der Glucose); 3,98-4,45 (4 H, H an den C(6) der Monosaccharidmolekeln); 3,75-3,98 (2 H, H am C(5) des Zuckers); 3,65 (nicht interpretierbar, fehlt beim partialsynthetischen Produkt); 2,02

(36 H, Methylprotonen der Acetoxygruppen und der Polyenkette); 1,6 (H_2O), 0,7-1,4 ppm (Äthanol und Paraffin). - IR.: 964 und 978 ($-CH=CH-$ *trans*), 1180 ($-C-O-C-$ Äther), 1230 (Ester $-C=O-$), 1580 und 1614 ($-C=C-$ konj. Polyen), 1717 und 1757 (konj. und nicht konj. Ester $-C=O$), 2960 (aliph. CH), 3442 cm^{-1} (wenig Kristallwasser).

Bei allen drei Verbindungen kann festgestellt werden, dass sich die peracetylierten Substanzen wesentlich besser für einen spektroskopischen Nachweis eignen als die natürlich vorkommenden.

Qualitativer Zuckernachweis. - Für den Nachweis der Zuckerkomponenten wurden 10 mg der einzelnen Verbindungen in 1,5 ml Äthanol und 0,5 ml wässriger NH_3 -Lösung (25%) während *ca.* vier Tagen verseift, das ausgefallene Ammoniumsalz des Crocctins abfiltriert und das Gemisch im Phasenpaar *n*-Butanol/ H_2O verteilt. Vor dem Eindampfen im RV. wurde die wässrige Phase zur Entfernung der restlichen Carotinoide mehrmals mit *n*-Butanol gewaschen.

Papierchromatographie (PC). Für die papierchromatographische Trennung [14] wurde der Zucker, gelöst in wenig 50proz. Äthanol auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetragen, im Laufmittel Äthylacetat/Pyridin/ H_2O 55:25:20 entwickelt, das Papier mit einer Mischung von 0,5 g *m*-Phenylendiamin, 1,2 g $SnCl_2$, 20 ml konz. Essigsäure und 80 ml Äthanol besprüht und während *ca.* 20 Min. bei 120° getrocknet. - In diesem System weist Glucose einen Rf-Wert von *ca.* 0,3, Gentiobiose von *ca.* 0,2 auf.

Dünnschichtchromatographie (DC). Die dünnschichtchromatographische Trennung [15] der abgespaltenen Zuckerkomponente erfolgte auf Kieselgel-G-Platten, gepuffert mit 0,23M Natriumacetat und einer Schichtdicke von 0,25 mm, im Laufmittel Äthylacetat/Methanol/Eisessig/ H_2O 60:15:15:10. Anschliessend wurden die Platten mit 0,5 g Thymol in 95 ml Äthanol und 5 ml konz. Schwefelsäure besprüht und während 15 Min. bei 120° erhitzt. - Glucose weist in diesem System einen Rf-Wert von *ca.* 0,4 und Gentiobiose von *ca.* 0,2 auf.

Gas-Chromatographie (GC). Für die Trennung im GC. wurden sowohl die abgespaltenen Zucker als auch die Referenzzucker silyliert. In 100 μ l trockenem Pyridin wurde 0,5 mg Zucker gelöst und mit 50 μ l HDMS (Hexamethyldisilazan, $(CH_3)_3SiNHSi(CH_3)_3$) gut geschüttelt, 25 μ l TMCS (Trimethylchlorsilan, $(CH_3)_3SiCl$) zugegeben und mit einem Stopfen verschlossen. Nach einer Reaktionsdauer von *ca.* 5 Min. wurde die Lösung unter Stickstoff bei 60-70° eingedampft. Für das Einspritzen in den Gas-Chromatographen wurden die silylierten Zucker in Petroläther gelöst. - Gerät: Perkin-Elmer 990, Säule Nr. 2 Chromosorb G AW-DMCS 80/100.

Verbindung I: Kolonne 230°, Detektor und Injektion 260°. Retentionszeiten: 21,5 Min. (= Gentiobiose); Nebenspike bei 9,5, 11,5, 15,5 und 17,3 Min.

Verbindung II: Kolonne: Temperaturprogramm 154-222° mit einer Progressionsrate von 24°/Min. Detektor 260, Injektionstemperatur 263°. Retentionszeiten: 10,3 Min. (α -D-Glucose), 16,6 Min. (β -D-Glucose), 49,2 Min. (Gentiobiose); Nebenspike 36,5, 38,5, 42,5 und 47 Min.

Verbindung III: Kolonne 154°, Detektor- und Injektionstemperatur 200°. Retentionszeiten: 10,5 Min. (α -D-Glucose), 16,8 Min. (β -D-Glucose); Nebenspike 6,5 und 8 Min.

Die Nebenspike (maximal 8%) sind durch die Isomerisierung der Glucose resp. Gentiobiose während der Hydrolyse zu erklären [16]. Werden als Referenz D-Glucose und Gentiobiose den Bedingungen der Hydrolyse unterworfen, so erscheinen im GC. die Nebenspike bei den gleichen Retentionszeiten und mit gleicher Intensität wie bei den Zuckern der verseiften Verbindungen.

Partialsynthese der Safran-Glykoside. - Zu Vergleichszwecken wurde nach der Methode von Kuhn [7] und Brauns [12] der Crocetin-di-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosyl)-ester und der Crocetin-di-(2,3,4,8,9,10,12-hepta-O-acetyl- β -D-gentiobiosyl)-ester partialsynthetisiert. Das für die Synthese als Ausgangsprodukt benötigte Dinatriumsalz des Crocetins wurde aus Crocetin-diäthylester dargestellt. 1 g Crocetin-diäthylester wurde in 120 ml einer ges. methanolischen NaOH-Lösung *ca.* 9 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde das Dinatriumsalz abzentrifugiert, in 47 ml Dioxan/ H_2O 3:4 unter Kochen gelöst, heiss filtriert und das abgekühlte Filtrat mit 30 ml Dioxan versetzt, worauf das Crocetin-di-natriumsalz auskristallisierte (Ausbeute 806 mg = 84%).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. Pfander & M. Hoädler, *Helv.* 57, 1641 (1974).
 [2] S. Aschoff, *Berl. Jb.* 51, 142 (1818).

- [3] *B. Quadrat*, J. prakt. Chem. [1] 56, 68 (1852); *Fr. Rochleder*, *ibid.* 72, 394 (1857); 74, 1 (1858); *B. Weiss*, *ibid.* 101, 65 (1867); *R. Kayser*, Ber. deutsch. chem. Ges. 17, 2228 (1884); *E. Fischer*, *ibid.* 21, 988 (1888); *E. Schunck et al.*, Liebigs Ann. Chem. 278, 349 (1894); *B. Pfyhl et al.*, Z. Unters. Nahrungs- u. Genussmittel 16, 237 (1906); *B. Pfyhl et al.*, Chem.-Ztg. 30, 299 (1906); *F. Decker*, Arch. Pharmaz. 252, 139 (1914); *E. Winterstein*, Helv. 5, 376 (1922).
- [4] *P. Karrer & H. Salomon*, Helv. 10, 397 (1927); 11, 513 (1928); *R. Kuhn et al.*, Helv. 11, 716 (1928); *P. Karrer & H. Salomon*, Helv. 11, 711 (1928); *P. Karrer, A. Helfenstein & R. Widmer*, Helv. 11, 1201 (1928); *R. Kuhn, A. Winterstein & L. Karlovitz*, Helv. 12, 69 (1929); *P. Karrer & A. Helfenstein*, Helv. 13, 392 (1930); *P. Karrer, A. Helfenstein, H. Wehrli & A. Wettstein*, Helv. 13, 1084 (1930); *R. Kuhn & A. Winterstein*, Ber. deutsch. chem. Ges. 65, 646 (1932); *R. Kuhn, F. Moewus & D. Jerchel*, *ibid.* 71, 1541 (1938); *P. Karrer, F. Benz & M. Stoll*, Helv. 16, 297 (1933).
- [5] *R. Kuhn & F. L'Orsa*, Ber. deutsch. chem. Ges. 64, 1732 (1931).
- [6] *P. Karrer & K. Miki*, Helv. 12, 985 (1929); *P. Karrer, F. Benz, R. Morf, H. Raudnitz, M. Stoll & T. Takahashi*, Helv. 15, 1399 (1931).
- [7] *R. Kuhn & Y. Wang*, Ber. deutsch. chem. Ges. 72, 871 (1939).
- [8] *H. Inhoffen, O. Isler, G. von der Bey, G. Raspé, P. Zeller & R. Ahrens*, Liebigs Ann. Chem. 580, 7 (1953).
- [9] *F. Haller*, Dissertation, Univ. Bern 1974.
- [10] *P. Karrer & E. Jucker*, «Carotinoide», Birkhäuser-Verlag, Basel 1948, S. 285.
- [11] *W. Vetter et al.* in «Carotenoids», ed. by O. Isler, Birkhäuser-Verlag, Basel 1971, S. 243.
- [12] *D. H. Brauns*, J. Amer. chem. Soc. 49, 3170 (1927).
- [13] *K. Biemann, D. C. De Jongh & H. K. J. Schmoes*, J. Amer. chem. Soc. 85, 1763 (1971).
- [14] *H. Arm*, pers. Mitteilung.
- [15] *T. Mezzetti et al.*, J. Chromatogr. 74, 273 (1972).
- [16] *A. L. Lehninger*, «Biochemistry», Worth Publishers, Inc 70 Fifth Avenue New York, N.Y. 1971, S. 1011.

180. Selektive Funktionalisierung von Wortmannin mit Hilfe einer Furanring-Maskierung

von **Walter Haefliger, Zoltan Kis** und **Daniel Hauser**

Sandoz AG, Pharma Departement, Chemische Forschung, CH-4002 Basel

(26. V. 75)

Summary. Wortmannin (1) and its 11-desacetoxy derivative 2 are highly susceptible to nucleophiles, which limits the possibilities of transformation. Masking the furan ring by a new method allowed selective transformations with various reagents.

Kürzlich haben wir über die Isolierung [1] und entzündungshemmende Wirkung [2] von 11-Desacetoxy-wortmannin (2) berichtet. Im folgenden soll auf chemische Arbeiten, die mit Wortmannin (1) [3-5] und seinem 11-Desacetoxy-Derivat durchgeführt wurden, eingegangen werden¹⁾.

Obwohl 1 und 2 wesentliche strukturelle Unterschiede zu den Corticosteroiden aufweisen und die entzündungshemmende Wirkung aufgrund von Versuchen [2] mit adrenalectomierten Ratten nicht auf einer Stimulierung der Nebennieren beruhen dürfte, war es naheliegend, Wortmannin (1) in Analogie zu Cortison, Hydrocortison und den kommerzialisierten Folgeprodukten [6] zu funktionalisieren und zu derivie-

¹⁾ In früheren Arbeiten [1] [2] wurde das Kohlenstoffatom 21 der Formeln 1 und 2 (Schema 7) als C(20) bezeichnet.