Untersuchungen über Anthra-Glykoside aus *Rhamnus*-Arten, IV¹

Die Struktur der Cascaroside von *Rhamnus purshianus* DC

Investigations of the Anthra-glycosides from *Rhamnus* species, IV¹
The Structure of the Cascarosides from *Rhamnus purshianus* DC

HILDEBERT WAGNER und GÜNTER DEMUTH

Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

(Z. Naturforsch. **31b**, 267–272 [1976]; eingegangen am 6. Oktober 1975)

Rhamnus purshianus DC, Cascaroside, Aloin-8-O- β -D-glucopyranoside, Anthron-C, O-glykoside.

The Cascarosides A, B, C and D, for the first time isolated by FAIRBAIRN *et al.* from the bark of *Rhamnus purshianus* DC, have been structurally elucidated as 8-O- β -D-glucopyranosides of aloin and 11-desoxy-aloin respectively by means of partial hydrolysis, NMR spectroscopy, sugar analysis and DC measurements.

Einleitung

Neben Aloin und 11-Desoxy-Aloin² stellen die von FAIRBAIRN und Mitarb.^{3–5} erstmals aus der amerikanischen Faulbaumrinde isolierten Cascaroside die Hauptglykoside der Droge dar. Aus dem chromatographisch in vier Glykoside auftrennbaren Cascarosid-Komplex konnten von den Autoren die Cascaroside A und B rein dargestellt werden. Sie lieferten bei milder Hydrolyse Aloin und nach oxidativer Spaltung mit Eisen(III)-chlorid in salzsaurer Lösung das Aloeemodin. Neben Glucose wurde ein zweiter nicht identifizierter Zucker nachgewiesen. Der wesentliche Unterschied der beiden Glykoside war die optische Drehung. FAIRBAIRN und Mitarb.⁶ vermuteten daher das Vorliegen stereoisomerer Verbindungen. Sie postulierten außerdem, daß die beiden nachgewiesenen Zucker entweder als Disaccharid an eine phenolische OH-Gruppe oder getrennt an eine phenolische und eine alkoholische Gruppe des Aloins gebunden sein könnten. Die Cascaroside C und D wurden nur als Gemisch erhalten. Da nach salzsaurer Eisen(III)-chlorid-Behandlung Chrysophanol nachgewiesen wurde, war das Vorliegen von O-Glykosiden des Desoxyaloins wahrscheinlich.

Zur endgültigen Strukturaufklärung isolierten wir die vier Cascaroside aus einem *Rhamnus*

purshianus-Extrakt des Handels durch Polyamid-Säulenchromatographie und präparative Papierchromatographie⁷.

Ergebnisse

Amorphes Cascarosid A schmolz zwischen 184 u. 187 °C, Cascarosid B zwischen 175 u. 178 °C und damit durchschnittlich um 10 °C höher als von FAIRBAIRN und SMIC⁴ angegeben. Die Cascaroside C und D wurden ebenfalls chromatographisch rein erhalten. Nach Hydrolyse von Cascarosid A und B mit 0,1 N Schwefelsäure konnte neben Aloin als einziger Zucker nur Glucose nachgewiesen werden. Hydrolyseversuche mit Emulsin und β -Glucosidase lieferten Aloeemodin. In der Äthylacetatausschüttelung der Naringinase-Hydrolyse war dünnschichtchromatographisch ein Glykosid nachzuweisen, das gleiche Laufhöhe wie authentisches Aloeemodin-8-O-glucosid hatte. Wie sich später zeigte, ließ sich dieses Glykosid aus den Cascarosiden A und B in größerer Ausbeute durch 15 Min. Behandlung mit Pyridin erhalten. Durch präparative Papierchromatographie erhielten wir aus diesen Ansätzen ein Glykosid, das im IR-Spektrum und im Schmelzpunkt (Schmp. = 237 °C) mit authentischem Aloeemodin-8-O- β -D-mono-glucopyranosid⁸ übereinstimmte. Um sicher zu sein, daß in den Cascarosiden neben der C-C-verknüpften Glucose nur 1 Mol O-gebundene Glucose vorhanden ist, wurde der Aloeemodinanthron- und Zuckeranteil von Cas-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. WAGNER, Institut f. Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität, D-8000 München 2, Karlstraße 29, BRD.

carosid A und B quantitativ spektrophotometrisch bestimmt. Wir erhielten in Anlehnung an die Methode von SCHRATZ und VETHACKE⁹ für die Cascaroside A und B einen Agluconanteil von 42,1% bzw. 42,9% (theoret. 44,2%), berechnet als Aloe-emodinanthron. Für den Zuckeranteil lieferte die von MALLOV und Mitarb.¹⁰ modifizierte Anthron-Methode¹¹ pro Mol Cascarosid 1,89 bzw. 1,85 Mol Glucose. Nach dem Ergebnis der Enzym-Hydrolyse mußte die O-gebundene Glucose die 8-Stellung einnehmen. Die β -Verknüpfung ergab sich aus dem bei $\delta = 4,93$ auftretenden Dublett mit einer Kopplungskonstante von 8 Hz (gem. in Methanol). Das von Cascarosid B aufgenommene Felddesorptions-Massenspektrum ergab wegen einer geringen Natriumsalz-Verunreinigung ein kationisiertes Ion $(M + Na)^+$ bei m/e 603. Damit sind das Molekulargewicht der Cascaroside mit 580 und die Diglykosidstruktur eindeutig gesichert. Das in amorphem Zustand erhaltene Cascarosid-Acetat-Gemisch lieferte annähernd 11 Acetylgruppen. Da Lösungen vom Acetat im UV-Licht intensiv fluoreszierten¹² und in seinem IR-Spektrum eine C=O-Gruppe fehlte, dürfte das Acetat der Anthranolform gebildet worden sein.

Im $(CD_3)_2SO$ -NMR-Spektrum von Cascarosid A erscheinen bei $\delta = 6,83$ und $\delta = 6,98$ die Signale für das H-2- bzw. H-4-Proton. Das für 2 Protonen integrierende Multipllett bei $\delta = 7,27$ stammt von H-5 und H-7. Das H-6-Proton ergibt ein Tripllett bei $\delta = 7,59$ mit einer Kopplungskonstante von 8 Hz. Die freie phenolische OH-Gruppe gibt ein Signal bei $\delta = 11,82$. Die Aromatenprotonen von Cascarosid B sind etwas zu höherem Feld verschoben und erscheinen bei $\delta = 6,76$ (H-2), $\delta = 6,91$ (H-4), $\delta = 7,22$ (H-5, H-7) und $\delta = 7,53$ (H-6). Das phenolische OH liegt bei tieferem Feld ($\delta = 12,05$). Auffallend war beim Stehenlassen einer DMSO-Lösung von Cascarosid A oder B eine zunehmende Farbvertiefung nach rot. NMR-Messungen in Abständen von 15–30 Min. ließen vor allem Änderungen im Bereich der Aromaten-Protonen erkennen. Die Farbänderung war auf eine geringfügige Aufspaltung in Aloeemodingleucosid, die Änderung im NMR-Spektrum auf eine Ineinander-Umwandlung von Cascarosid A und Cascarosid B zurückzuführen. Nach 1 Stde. waren etwa 30% Cascarosid A in Cascarosid B umgewandelt. Nach 3½-stündigem Stehen hatte sich ein Gleichgewicht zwischen Cascarosid A und B eingestellt. Hinweise, daß hier eine Umwandlung in Diastereoisomere stattgefunden

hat, geben die optischen Drehwerte und die CD-Messungen der beiden Cascaroside. Cascarosid A ergab in Methanol eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{30} = -36,8^\circ$, Cascarosid B eine von $[\alpha]_D^{30} = -104,40^\circ$. Dieses Ergebnis stimmte unter Berücksichtigung des anderen Lösungsmittels und der höheren Meßtemperatur in etwa mit den von FAIRBAIRN und SIMIC⁴ gefundenen Werten überein (-40° , -110°). Unterschiede zeigten sich bei den optischen Drehwerten der Aloine, die aus Cascarosid A und B durch 3-stündige H_2SO_4 -Hydrolyse (0,1 N, 70 °C, N_2) erhalten wurden. Aloin aus Cascarosid A wies eine Drehung von $-16,3^\circ$, Cascarosid B eine von -42° auf. Die Werte von FAIRBAIRN⁶ lagen bei $+7,6^\circ$ und $-47,8^\circ$. Möglicherweise sind hierfür die etwas abweichenden Hydrolysebedingungen verantwortlich.

Aus diesen Ergebnissen könnte man schließen, daß auch Aloin in zwei derartigen Diastereomeren vorkommt. In der Literatur finden sich Hinweise, daß im Isobarbaloin^{13,14} aus der Westindischen Aloe ein Stereoisomeres des Aloins vorliegen könnte^{12,15}. Die Untersuchungen von DURAND und PARIS¹⁶ haben aber ergeben, daß es sich hierbei um keine reine Substanz gehandelt hatte. Auch das von LEGER¹⁷ beschriebene β -Barbaloin soll keine einheitliche Verbindung gewesen sein¹⁸. Dagegen konnte ZINN¹⁹ aus Aloinacetat, das durch Acetylierung von Kap-Aloin hergestellt worden war, durch Verseifung ein Aloin zurückgewinnen, das wie die aus den Cascarosiden erhaltenen Aloine eine negative Drehung aufwies, während das aus Kap-Aloe oder auch das von uns aus Curacao-Aloe isolierte Aloin einen positiven Drehwert besaß.

Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, verschiedene Formen des Aloins aus der Droge zu isolieren. Offenbar kommt es schon in der Pflanze oder während der Isolierung zur Bildung der anderen diastereomeren Form und damit zur Einstellung eines Mittelwertes bei der Drehung, worauf auch WIDMAIER²⁰ kürzlich hingewiesen hat. Bei den Cascarosiden dürfte die zusätzliche Glucosidierung des Aloins die Stabilisierung zweier Stereoisomeren begünstigen.

Deutliche Unterschiede zeigten die in Trifluoräthanol aufgenommenen Dichrogramme von Cascarosid A und B (siehe Abb. 1). Die unterschiedliche Lage vieler Banden von Cascarosid A und B könnte darauf hindeuten, daß nicht in beiden Fällen das gleiche chromophore System vorliegt. Das Auftreten der langwelligsten Bande der Cascaroside bei 348 bzw. 366 nm im Gegensatz zum Aloin, dessen langwelligste Bande bei 321 nm liegt (siehe experimenteller Teil), ist mit Sicherheit auf den unsymmetri-

schen Ketochromophor zurückzuführen. Das Aloin besitzt wegen der beiderseitigen Wasserstoffbrückenbindungen demgegenüber eine deutliche Molekülsymmetrie.

Abb. 1. Circular-Dichrogramme der Cascaroside A (—) und B (---).

Der strukturelle Unterschied zwischen Cascarosid A und B dürfte daher nur in der räumlichen Anordnung der Glucose am C-10 liegen, wobei aus dem CD zu folgern ist, daß die Glucose in einem Fall nach vorne, im anderen nach hinten gerichtet ist. Die gegenseitige Ineinander-Umwandelbarkeit ist durch den Übergang in die Anthranolform 2 erklärbar. Die Anthron-Formen sind hierbei bevorzugt. Für Cascarosid A und B kann man daher die beiden diastereoisomeren Formen 1 und 2 schreiben.

Eine genaue Zuordnung allein aus dem CD ist nicht möglich. Das Dreiding-Modell zeigt außerdem, daß 1 und 3 jeweils noch in zwei Konformationen auftreten können. Energetisch begünstigt dürfte die Konformation sein, bei der der Sauerstoff der

Carbonylgruppe und das C-10-Proton bezogen auf die C-9/C-10-Achse *trans*-Konfiguration besitzen und die Glucose am C-10 angenähert eine axiale Stellung einnimmt.

Den Cascarosiden A und B muß daher die Struktur 8-O-(β -D-Glucopyranosyl)-, 10-C-glucopyranosyl-1.8-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9-anthron oder 8-O- β -D-Glucopyranosyl-aloin zukommen.

Da aus der salzsauren, oxidativen, der schwefelsauren und der Enzym-Hydrolyse von Cascarosid C und D analog Chrysophanol, 11-Desoxyaloin bzw. Chrysophanol-8-O- β -D-monoglucosid erhalten werden konnte, handelt es sich demnach um Stereoisomere des 8-O-(β -D-Glucopyranosyl)-, 10-C-glucopyranosyl-1.8-dihydroxy-3-methyl-9-anthrone oder des 8-O- β -D-Glucopyranosyl-desoxy-aloin.

Beschreibung der Versuche

Isolierung der Cascaroside A und B

7,5 g *Rhamnus purshianus*-Extrakt der Milanfarma, Mailand, der die Cascaroside in schwach angereicherter Form enthielt und teilweise von Gerb- und Begleitstoffen befreit war, wurde mit 15 g Polyamidpulver sorgfältig verrieben und vorsichtig auf eine Polyamidsäule aufgetragen.

Säulenhöhe: 80 cm, Säulendurchmesser: 6 cm, Adsorbens: Polyamid 100–150 μ m, Laufmittel: Wasser, Tropfgeschwindigkeit: 25 Tropfen/Min.

Die Elution wurde im UV 360 nm verfolgt. Auf zwei sehr schmale gelb fluoreszierende Zonen folgten zwei fast ineinander übergehende dunkelrote Zonen, die vorwiegend den Cascarosiden entsprachen. Daran schlossen sich eine graublau-, gelbbraun-, türkisfarbene-, gelbbraun- und rötlichblau fluoreszierende Zone an.

Es wurden je nach Zonenbreite Fraktionen von 100 bis 250 ml aufgefangen und gefriergetrocknet. Die erhaltenen, hellgelb gefärbten Substanzgemische enthielten Cascaroside, Aloin und Desoxyaloin in unterschiedlicher Konzentration.

Aus den mit den Cascarosiden A und B angereicherten Fraktionen wurden durch präparative,

absteigende Papierchromatographie die beiden Cascaroside isoliert. Die Substanzen wurden in Methanol gelöst und strichförmig aufgetragen. Papier: Schleicher und Schüll 2043 b Mgl, Laufmittel: Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:17:13), Laufzeit: mindestens 15 Stdn.

Nach dem Entwickeln und Trocknen der Chromatogramme erschienen die Cascaroside A und B unter dem UV 360 nm etwa 5–12 cm über der Startlinie als dunkelrot fluoreszierende Zonen. Die mit Methanol eluierten und zur Trockene eingedungen Cascaroside (aus 6–8 Chromatogrammen) wurden wieder in 1–2 ml Methanol p.a. aufgenommen, in ein Becherglas übergeführt und mit Chloroform p.a. im Überschuß versetzt, wobei die Cascaroside ausflockten. Nach dem Absetzen bzw. Zentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit dekantiert. Der Rest der Lösungsmittel wurde abgedunstet oder mit Stickstoff abgeblasen. Wir erhielten hellgelbe, amorphe, chromatographisch reine Substanzen. Die Wassergehaltsbestimmung von Cascaroid A und B ergab 5,62% bzw. 5,87% H₂O, entsprechend 2 Mol H₂O, das auch bei scharfem Trocknen über Diphosphorpentoxid nicht entfernt werden konnte.

Cascaroid A: C₂₇H₃₂O₁₄ (580,54) · 2 H₂O, Schmelzbereich = 184–187 °C (unter Braunfärbung), $[\alpha]_D^{30} = -36,8^\circ$ ($c = 0,8786$ in Methanol), ($a_{578} = -35,3$; $a_{546} = -31,9^\circ$).

DC: Kieselgelkarten SIF der Fa. Riedel de Haen, Äac-MeOH-Wa (100:17:13), Detektion meth. KOH bei 360 nm, $R_f = 0,14$, PC aufsteigend: 2043 b Mgl der Fa. Schleicher u. Schüll Äac-MeOH-Wa (100:17:13), meth. KOH bei 360 nm, $R_f = 0,11$; UV (Methanol p.a.): $\lambda_{\max}$ (259), 267, 296, 322, (354) nm; (Methanol/NaOH): $\lambda_{\max}$ 221, 269, 351, 371, 391, (428), (454) nm.

CD (Trifluoräthanol): Konz. 0,86/3,3158; 348 (+4,57), 313 (−7,29), 285 i (−2,45), 259 (+1,92), 241 (+3,47), 231 (+3,80), 209 (−12,9).

IR (in KBr): CO 1630 cm^{−1}, OH 3200–3600 cm^{−1}, NMR —100 MHz [(CD₃)₂SO, TMS int.]:

Aglycon: Ar-OH: $\delta = 11,82$ ppm (s, br) 1 H; H-6: $\delta = 7,59$ (tr, $J = 8$ Hz); H-7, H-5: $\delta = 7,27$ (m); H-4: $\delta = 6,98$ (s); H-2: $\delta = 6,83$ (s); Ar-CH₂-O, Ar-CH-Ar: $\delta = 4,53$ (s) 3 H.

Zucker: CH-1' (−O-Gluc.): $\delta = 4,97$ ppm (s, br); −CH- und OH-Gluc.: $\delta = 4,0$ –2,6.

NMR-100 MHz (CD₃OD, TMS int.): Zucker: CH-1' (−O-Gluc.): $\delta = 4,92$ ppm (d, $J = 8$ Hz): β -Verknüpfung.

Cascaroid B: C₂₇H₃₂O₁₄ (580,54) · 2 H₂O; FD-MS $m/e = 603$ (M + Na)⁺, Schmelzbereich = 175–178 °C (unter Braunfärbung), $[\alpha]_D^{30} = -104,4^\circ$ ($c = 0,5243$ in Methanol).

DC: Kieselgelkarten SIF Äac-MeOH-Wa (100:17:13)/meth. KOH —360 nm, $R_f = 0,10$; PC aufsteigend: Äac-MeOH-Wa (100:17:13)/meth.

KOH bei 360 nm, $R_f = 0,08$; UV (Methanol p.a.): $\lambda_{\max}$ 264, 293, 325, (354) nm.

(Methanol/NaOH): $\lambda_{\max}$ 221, 269,5, 350, 370,5, 390,5, (427), (453) nm.

CD (Trifluoräthanol) Konz.: 0,95/3,1149; 366 (−2,88), 334 (+0,85), 294 (−1,15), 264 (−0,55), 252 (+1,32), 230 (−8,38) etwa 208 (+17).

IR (in KBr): CO 1630 cm^{−1}, OH 3200–3600 cm^{−1}, NMR —100 MHz [(CD₃)₂SO, TMS int.]:

Aglycon: Ar-OH: $\delta = 12,05$ ppm (s, br); 1 H; H-6: $\delta = 7,53$ (tr, $J = 8$ Hz); H-7, H-5: $\delta = 7,22$ (m); H-4: $\delta = 6,91$ (s); H-2: $\delta = 6,76$ (s); Ar-CH₂-O, Ar-CH-Ar: $\delta = 4,52$ (s) 3 H.

Zucker: CH-1' (−O-Gluc.): $\delta = 4,93$ ppm (d, $J = 7$ Hz); CH- und OH-Gluc.: $\delta = 4,0$ –2,6.

NMR —100 MHz (CD₃OD, TMS int.): Zucker: CH-1' (−O-Gluc.): $\delta = 4,94$ ppm (d, $J = 8$ Hz).

Saure Hydrolyse der Cascaroside

5 mg Substanz wurden mit 0,1 N Schwefelsäure 20 Min. bei 100 °C oder zur schonenderen Spaltung 3 Stdn. bei 70 °C unter Stickstoffatmosphäre hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit Äthylacetat ausgeschüttelt, die Äthylacetatphase säurefrei gewaschen und durch DC und PC in Äac-MeOH-Wa (100:17:13) untersucht. Testsubstanz: Aloin.

Sprühreagentien: Methanolische KOH; Echtblausalz B-Reagens, *p*-Nitroso-N,N-dimethylanilin.

UV-Messung und optische Drehung der erhaltenen Aloine.

	Aloin aus Cascaroid A	Aloin aus Cascaroid B
UV (Methanol p.a.): $\lambda_{\max}$	252, 260, 268,5 295,5, 358 nm	251, 259, 268,5 294,5, 360 nm
Optische Drehung	$[\alpha]_D^{25} = -16,3^\circ$ ($c = 0,258$ in MeOH)	$[\alpha]_D^{23} = -42^\circ$ ($c = 0,2243$ in MeOH)

Aloin-Testisolierung aus Curacao-Aloe:

$[\alpha]_D^{23} = +5,12^\circ$ ($c = 0,8872$ in MeOH) ($a_{578} = 4,5^\circ$; $a_{546} = +3,4^\circ$).

Die wäßrige Zuckerlösung der Hydrolyse wurde mit fein verriebenem Bariumhydroxid neutralisiert, filtriert und durch azeotrope Destillation auf 0,5 ml eingengt. Die PC-Überprüfung ergab in *n*-Bu-Ei-Wa (42–44 Stunden Laufzeit) und Äac-Pyr-Wa (26 Stunden Laufzeit) für Cascaroid A und B nur Glucose. Eine 20 Min. Hydrolyse mit 5-proz. Salzsäure bei 100 °C lieferte als Aglykon vorwiegend Aloemodin.

Oxidative Hydrolyse der Cascaroside

Etwa 3 mg Glykosid wurden in 5 ml 5-proz. Salzsäure unter FeCl₃-Zugabe (ungefähr 20 mg) 30 Min.

unter Rückfluß hydrolysiert. Das Hydrolysengemisch wurde mit 10 ml Wasser verdünnt, das Aglykon 2mal mit je 10 ml Äther ausgeschüttelt und die Ätherphasen säurefrei gewaschen. Nach dem Einengen wurde der Rückstand in 1 ml Methanol gelöst und chromatographisch mit Aloeemodin-Testsubstanz verglichen.

DC: Kieselgel/Benzol-Äthanol (8:2)/methanol. KOH.

PC: Schleicher u. Schüll 2043 b Mgl/Petroläther-Toluol-Xylol-Methanol (4:1:1:2)/methanol. KOH.

Enzymatische Hydrolyse der Cascaroside

10 mg Substanz wurden in 10 ml Soerensen-Puffer (51,0 g 1/15 M KH_2PO_4 -Lösung + 49,0 g 1/15 M Na_2HPO_4 -Lösung) gelöst, 2 mg Enzym (Emulsin, β -Glucosidase oder Naringinase) hinzugefügt und 5 Tage im Trockenschrank auf genau 35 °C gehalten. Stellte das Reaktionsgemisch keine klare Lösung dar, so wurde es am Magnetrührer während der Inkubationszeit in Bewegung gehalten. In einem Parallelversuch wurden die Aktivität und in einem Blindversuch mit inaktiviertem Enzym die Veränderungen durch andere Reaktionseinflüsse festgestellt.

Der entstandene Niederschlag wurde durch DC und PC auf Aloeemodin, die Äthylacetatausschüttelung und die wässrige Phase auf Anthraglykoside untersucht.

Quantitative spektrophotometrische Bestimmungen

1. Aglykonbestimmung

2–4 mg Glykosid, genau gewogen, wurden in 5 ml 5-proz. Salzsäure unter FeCl_3 -Zugabe (ungefähr 20 mg) bei 100 °C hydrolysiert, das Hydrolysengemisch mit 10 ml Wasser verdünnt und das Aglykon 3mal mit 10 ml Äther quantitativ ausgeschüttelt. Den Äther wäscht man säurefrei, schüttelt das Aglykon zweimal mit je 10 ml 5-proz. Natronlauge aus und verdünnt die alkalische Phase in einem

Mittelwerte der Agluconbestimmung von Cascarosid A und B.

Substanz	Einwaage	Extinktion der Aloe-emodin-Lösung	Aloe-emodin-gehalt	Entsprechender Aloe-emodin-anthron-gehalt
Aloin (MG 418)	2,5 mg	0,150	1,62 mg	1,53 mg
Cascarosid A (MG 580)	3,1 mg	0,128	1,38 mg	1,31 mg
Cascarosid B (MG 580)	2,9 mg	0,121	1,31 mg	1,24 mg

Für Cascarosid A ergab sich ein Mittelwert von 42,1%, für Cascarosid B einer von 42,9% Aloeemodin-anthron.

Meßkolben mit Methanol p.a. auf 100,0 ml. Diese Lösung wurde gegen eine Vergleichslösung aus 20 ml 5-proz. Natronlauge und 80 ml Methanol p.a. in 1 cm Küvetten im Eppendorf-Photometer bei 546 nm gemessen.

Für die Berechnung des Aloeemodingehaltes der Cascaroside legten wir die im Parallelversuch mit Aloin erhaltene Extinktion als Bezugswert zugrunde und rechneten auf Aloeemodinanthron um.

2. Zuckerbestimmung mit der Anthron-Methode

2–6 mg Glykosid, genau gewogen, wurden mit Wasser zu 10,0 ml gelöst. 2,0 ml dieser Lösung wurden tropfenweise mit 6-proz. wässriger Ammonium-reineckatlösung bis zur leichten Rosafärbung versetzt und auf 5,0 ml mit Wasser ergänzt. 2,0 ml dieser Lösung wurden im Eisbad mit 5,0 ml 0,2-proz. Anthronlösung in 95-proz. Schwefelsäure versetzt und 20 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde die Extinktion bei 623 nm im Eppendorf-Photometer gegen eine Blindlösung gemessen.

In jeder Versuchsreihe wurde gleichzeitig eine Bestimmung mit einer Glucoselösung durchgeführt. Etwa 9,5 mg Glucose wasserfrei (Merck Nr. 8337), genau gewogen, wurden in 100 ml Wasser gelöst, davon 2 ml mit der Ammoniumreineckatlösung versetzt und, wie oben beschrieben, weiterbehandelt.

Zum Vergleich bestimmten wir in den gleichen Versuchsreihen jeweils auch Aloin und berücksichtigten diesen Wert für die Berechnung.

Mittelwert der Glucosebestimmung von Cascarosid A und B.

Substanz	Einwaage	Extinktion	Vorh. Glucose-menge in der Probe	Auf Einwaage umgerechnete Glucose-menge
Glucose wasserfrei	9,3 mg	0,365	74,4 μg	–
Aloin	3,2 mg	0,490	104,0 μg	1,3 mg
Cascarosid A	3,5 mg	0,787	160,4 μg	2,05 mg
Cascarosid B	3,3 mg	0,743	151,2 μg	1,89 mg

Als Mittelwert ergaben sich für Cascarosid A insgesamt 1,89 Mol und für Cascarosid B 1,85 Mol Glucose.

Cascarosidmischacetat

20 mg Substanz wurden in 1 ml Pyridin gelöst und mit 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Das Gemisch wurde 1 Stde. am Magnetrührer und über Nacht stehen gelassen. In Eiswasser flockte eine gelbliche Substanz aus, die in Lösung eine intensive gelblich-blaue Fluoreszenz zeigte. DC: Kieselgel HF/Benzol-Äc. (1:1) $R_f = 0,4$; UV 360 nm: blaue Fluoreszenz.

IR (in KBr): Ester-CO 1740 cm^{-1} ; Keto-CO nicht mehr vorhanden.

NMR (CDCl_3 , TMS int.): annähernd 11 Acetylgruppen (Anthranolform).

Isolierung von Aloemodin-8-O- β -D-glucosid

40 mg Cascarosid wurden in 1,5 ml Pyridin p.a. gelöst, die Lösung 15 Min. stehengelassen und das Gemisch durch PC auf 2 Papierbögen getrennt. Papier: Schleicher u. Schüll 2043 b, absteigend, Laufmittel: Äac-MeOH-Wa (100:17:13), Laufzeit: 8–10 Stdn.

Die ungefähr 25 cm über der Startlinie bei UV 360 nm rot erscheinende Zone wurde ausgeschnitten und die Substanz durch 3mal 10-minütige MeOH-Eluierung am Magnetprüher eluiert. Nach Filtration durch ein hartes Filter wurde die Lösung zur Trockene gebracht, der Rückstand in etwa 4 ml Methanol p.a. aufgelöst und auf 1–2 ml eingeeengt. Im Kühlschrank flockte eine Substanz aus. Nach dem Zentrifugieren, Dekantieren der überstehenden Flüssigkeit und Trocknen über P_2O_5 bei 100 °C/12 Torr entstanden kräftig gelbe Blättchen vom Schmp. 237 °C (Lit.: 236–239 °C).

DC: Kieselgelkarten SIF/Äac-MeOH-Wa (100:17:13), $R_f = 0,47$; Polyamid/MeOH-Wa (3:1) $R_f = 0,43$; Testsubstanz: Aloemodin-8-O- β -D-glucosid.

cosid, IR (in KBr): Vergleich mit authentischer Substanz⁸.

Cascarosid C und D

Die Isolierung erfolgte ebenfalls durch präparative PC der mit den Cascarosiden C und D angereicherten Polyamid-Säulen-Fractionen, die Hydrolysen wie bei den Cascarosiden A und B.

Der entstandene Niederschlag der enzymatischen Spaltung wurde durch DC und PC untersucht und als Chrysophanol identifiziert. Die Äthylacetatausschüttelung ergab auf Kieselgel/Äac-MeOH-Wa (100:17:13) Desoxyaloin vom $R_f = 0,65$.

Die chromatographische Identifizierung von Chrysophanol-8-O- β -D-glucosid erfolgte durch Vergleich mit synth. Chrysophanol-8-O-glucosid (auf Kieselgel in Äac-MeOH-Wa (100:17:13) $R_f = 0,54$).

Wir danken Herrn Prof. H. R. SCHULTEN, Institut für physikalische Chemie der Universität Bonn, für die Aufnahme des Felddesorption-Massenspektrums. Unser Dank gilt auch Herrn Prof. SNATZKE (Universität Bochum) für die Aufnahme und Diskussion der Dichrogramme und ferner Fräulein SCHILD (Max-Planck-Institut für Biochemie, München) für die Ausführung der hochauflösenden NMR-Spektren.

- ¹ H. WAGNER und G. DEMUTH, Z. Naturforsch. **29c**, 204 [1974].
- ² R. BAUMGARTNER und K. LEUPIN, Pharm. Acta Helv. **36**, 244 [1961]; ibid. **36**, 445 [1961].
- ³ J. W. FAIRBAIRN und V. K. MITAL, J. Pharm. Pharmacol. **9**, 432 [1957]; ibid. Suppl. **10**, 217 T [1958].
- ⁴ J. W. FAIRBAIRN und S. SIMIC, J. Pharm. Pharmacol. Suppl. **12**, 45 T [1960].
- ⁵ J. W. FAIRBAIRN, Lloydia **27**, 79 [1964].
- ⁶ J. W. FAIRBAIRN, C. A. FRIEDMANN und S. SIMIC, J. Pharm. Pharmacol. Suppl. **15**, 292 T [1963].
- ⁷ H. WAGNER und G. DEMUTH, Z. Naturforsch. **29c**, 444 [1974].
- ⁸ L. HÖRHAMMER, L. FARKAS, H. WAGNER und E. MÜLLER, Chem. Ber. **97**, 1662 [1964].
- ⁹ E. SCHRATZ und H. J. VETHACKE, Planta Med. **6**, 44 [1958].

- ¹⁰ S. MALLOV, J. M. MCKIBBIN und J. S. ROBB, J. Biol. Chem. **201**, 825 [1953].
- ¹¹ D. L. MORRIS, Science **107**, 254 [1948].
- ¹² H. MÜHLEMANN, Pharm. Acta Helv. **27**, 9 [1952]; ibid. **27**, 17 [1952].
- ¹³ E. LÉGER, Bull. Soc. Chim. France **23**, 787 [1900].
- ¹⁴ E. LÉGER, J. Pharm. Chim. **16**, 592 [1902].
- ¹⁵ R. A. BARNES und W. HOLFELD, Chem. and Ind. **75**, 873 [1956].
- ¹⁶ M. DURAND und R. PARIS, Ann. Pharm. Franc. **18**, 846 [1960].
- ¹⁷ E. LÉGER, J. Pharm. Chim. **27**, 5 [1908].
- ¹⁸ M. DURAND, Diss., Paris 1958.
- ¹⁹ W. ZINN, Diss., Zürich (Dielsdorf) 1945.
- ²⁰ W. WIDMAIER, Diss., Tübingen 1975.