

102. Hermann Lutzmann: Cis-trans-Umlagerung der o-Oxyzimtsäure-glucoside, über das Glucosid der o-Hydrocumarsäure und das Vorkommen des Cumarins in der Tonkabohne.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 3. Mai 1940.)

Bei den Synthesen von β -d-Glucosido-o-cumarsäure (*trans*) und β -d-Glucosido-cumarinsäure (*cis*)¹⁾²⁾ wurde die Beobachtung gemacht, daß sich die beiden stereoisomeren Formen der o-Oxyzimtsäure-glucoside ineinander überführen lassen. Das Tetraacetat der *cis*-Verbindung lagert sich unter dem Einfluß von Pyridin/Essigsäureanhydrid in die stabilere *trans*-Form um³⁾. Durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht gelingt es, gluco-o-cumarsaures Natrium (*trans*) in wäßrig-neutraler Lösung zu 80—85% in die stereoisomere labile *cis*-Verbindung umzuwandeln⁴⁾⁵⁾. Die dabei eintretende Hydrolyse⁶⁾ des Substrates beträgt nur etwa 4%. Die vollzogene Umwandlung läßt sich leicht erkennen und prüfen an der völlig veränderten Salzbildung und daran, daß bei der Hydrolyse durch Säure oder Süßmandel-emulsin an Stelle von o-Cumarsäure das δ -Lacton der unbeständigen Cumarsäure — Cumarin — isolierbar ist.

Das als in der Natur vorkommend beschriebene⁷⁾ Hydro-o-cumarsäure- β -d-glucosid wurde leicht durch Hydrierung der β -d-Glucosido-o-cumarsäure (*trans*) erhalten.

Erst die Kenntnis der β -d-Glucosido-cumarinsäure (*cis*) und ihres Methylesters — beides bei der Hydrolyse Cumarin liefernde Glucoside¹⁾²⁾ — machte es möglich, mit Aussicht auf Erfolg die Frage zu untersuchen, ob das Cumarin als Cumarsäureglucosid⁴⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾ gebunden in der Natur vorkomme. Als Untersuchungsmaterial wurde die Tonkabohne (Frucht von *Dipteryx odorata*) gewählt, da sie Cumarin in besonders reichlicher Menge ent-

¹⁾ B. Helferich u. H. Lutzmann, A. **587**, 11 [1938].

²⁾ H. Lutzmann, Dissertat. Leipzig 1940 (D 15); dort Literatur.

³⁾ Vergl. O. Lutz, B. **43**, 2636 [1910]; W. H. Warren u. M. R. Grose, C. **1913** I, 241; P. Pfeiffer, B. **47**, 1582, Anm. 1, 1592 [1914]; O. Lutz, C. **1916** II, 216; O. Lutz, R. Klein u. A. Jirgensson, A. **505**, 307 [1933].

⁴⁾ Vergl. I. Herold, Seifensieder-Ztg. **66**, 162, 191 [1939].

⁵⁾ Vergl. R. Stoermer, B. **42**, 4870 [1909]; **44**, 660 [1911].

⁶⁾ A. Guillaume u. G. Tanret, C. **1988** I, 1791; Bull. Soc. Chim. biol. **18**, 556 [1936], dort Literatur.

⁷⁾ A. Navez, Bull. Acad. Belg. [5] **8**, 159 [1922].

⁸⁾ Edv. Hjelt u. H. Elving, C. **1908** I, 89; Öfversigt af Finska Vetenskaps-Societetens Förhandlingar **45**, 1902—1903, Nr. 1, Helsingfors 1903.

⁹⁾ C. Charaux, Bull. Soc. Chim. biol. **7**, 1056 [1925].

¹⁰⁾ J. Shinoda u. M. Imaida, Journ. pharmac. Soc. Japan **54**, 107 [1934].

¹¹⁾ P. Guérin u. A. Goris, Compt. rend. Acad. Sciences **170**, 1067 [1920]; Em. Bourquelot u. H. Hérissey, Compt. rend. Acad. Sciences **170**, 1545 [1920]; Ber. Schimmel Co. **1921**, 64; **1923**, 102; **1924**, 99; L. Herboth, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **263**, 180 [1925]; A. Ellmer, Ber. Schimmel Co. **1928**, 61.

¹²⁾ A. v. Lingelsheim, Ber. Schimmel Co. **1927**, 173; Festschrift für A. Tschirch [Leipzig 1926], S. 149; dort Literatur.

¹³⁾ E. Gildemeister u. Fr. Hoffmann, Die Ätherischen Öle **1**, 652 [1928]; dort Literatur; R. Späth, Monatsh. Chem. **69**, 75 [1936]; B. **70**, (A) 83 [1937].

hält⁴⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾). Für die Überlassung einer größeren Menge Tonkabohnen möchte ich auch an dieser Stelle der Firma Rich. C. Pottstock, Bremen, meinen besten Dank sagen.

Die Untersuchungen zeigen, daß Cumarin in freier, leicht durch Aceton extrahierbarer Form in den unbehandelten und „rumbehandelten“ Tonkabohnen vorhanden ist. Anzeichen für das Vorkommen sowohl eines Cumarin liefernden Glucosids⁴⁾^{7–13)}, wie β -d-Glucosido-cumarinsäure oder ihres Methylesters, als auch Cumarin-Additionsverbindungen wie Cumarin-*o*-cumarsäure¹⁹⁾, Cumarin-hydro-*o*-cumarsäure⁴⁾⁷⁾¹³⁾¹⁷⁾¹⁸⁾, Cumarin-gluco-*o*-cumarsäure oder Cumarin-gluco-hydro-*o*-cumarsäure⁷⁾ wurden nicht beobachtet.

Für die Möglichkeit zur Ausführung dieser Arbeit bin ich Hrn. Prof. Dr. B. Helferich zu großem Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

cis-trans-Umlagerung von Tetraacetyl- β -d-glucosido-cumarin-säure in Pyridin/Essigsäureanhydrid²⁰⁾.

Etwa 5 g des braunen, sirupösen Endproduktes der Synthese von Tetraacetyl- β -d-glucosido-cumarinsäure¹⁾ wurden zur Acetylierung mit 7 ccm Essigsäureanhydrid in 10 ccm absol. Pyridin 19 Std. bei 0° und 1 Stde. bei Zimmertemperatur belassen²¹⁾. Nach dem Versetzen des braunen Acetylierungsgemisches mit einem Gemisch von 100 ccm Eisessig und 50 ccm Wasser, Entfärben mit Kohle und Eingießen in 700 ccm Wasser trat alsbald Kry stallisation in farblosen Nadeln ein. Es wurden 3.1 g an Rohprodukt vom Schmp. 181° (unkorr.) gewonnen (6.8% d. Th. ber. auf 13.5 g Cumarin¹⁾).

Zur weiteren Reinigung wurde dieses Rohprodukt nochmals aus Eisessig-Wasser und noch 2-mal aus Aceton-Wasser umkristallisiert. Die Substanz ließ sich mit Krystallen von Tetraacetyl- β -d-glucosido-*o*-cumarsäure (*trans*) animpfen und glich in ihren Eigenschaften der *trans*-Verbindung¹⁾). Schmp. 186—187° (korrig.).

$$[\alpha]_D^{20} = -1.37^{\circ} \times 3.011 / 1 \times 0.0506 \times 1.474 = -55.3^{\circ} \text{ (in Chloroform).}$$

trans-cis-Umwandlung von β -d-glucosido-*o*-cumarsaurem Natrium durch Ultraviolett-Bestrahlung²⁾.

Zur Substratlösung wurden 3.442 g Glucosido-*o*-cumarsäure¹⁾²⁾ (1 Mol. Krystallwasser) mit 15 ccm Wasser befeuchtet und mit 50 ccm *n*/₅-Natronlauge (theoret. Menge) gelöst. Die Lösung war farblos und enthielt in 1 ccm praktisch die 0.04 g Phenolglucosid äquivalente Menge von 0.054 g Natriumsalz der Glucosido-*o*-cumarsäure.

Die Ultraviolett-Bestrahlung wurde in einem 100 ccm fassenden Stehkolben aus Quarzglas durchgeführt. Während der Bestrahlung stellte sich die Temperatur im Mittel auf 40° ein.

¹⁴⁾ F. Wöhler, A. **98**, 66 [1856].

¹⁵⁾ H. A. Vogel, Ann. Phys. **64**, 161 [1820]; E. Senft, Pharmaz. Praxis, Jahrg. II, Heft 3 [1904]; Ber. Schimmel Co. **1921**, 64.

¹⁶⁾ E. Albes, Ber. Schimmel Co. **1916**, 68/69.

¹⁷⁾ C. Zwenger u. H. Bodenbender, A. **126**, 257 [1863].

¹⁸⁾ C. Zwenger, A. **Spl. 5**, 100 [1867].

¹⁹⁾ C. Zwenger, A. **Spl. 8**, 30/31 [1870].

²⁰⁾ H. Lutzmann, Dissertat. Leipzig 1940, unter *o*-Oxizimtsäure-glucoside.

²¹⁾ R. Behrend u. P. Roth, A. **831**, 362 [1904]; E. Fischer u. O. Nouri, B. **50**, 915 [1917]; E. Fischer u. M. Bergmann, B. **50**, 1048 [1917].

Die Bestrahlungsergebnisse waren folgende:

1)

Tafel 1.

Reaktion, Befund	Vor der Bestrahlung	Nach der Bestrahlung
Bestrahlungszeit	—	6 Tage
pH(Indicatorpapier)	6.9—7.2	6.9
gemessene Drehung α_D^{10} (2-dm-Rohr)	—7.56°	—5.64°
Farbe der Lösung	farblos	gelb
Reaktion gegen Fehlingsche Lösung	negativ	deutlich positiv
Cumaringeruch	negativ	positiv
In sodaalkalischer Lösung Reaktion mit dem Diazoniumsalz des <i>p</i> -Nitranilins ²²⁾	gelb-braun	weinrot

2) Sodaalkalische Kaliumpermanganatlösung wurde vom Bestrahlungsgemisch sofort entfärbt.

3) Vergleich der Drehung des Bestrahlungsgemisches mit derjenigen der reinen *trans*-Verbindung und der reinen *cis*-Verbindung:

Tafel 2.

Bedingungen	<i>trans</i> -Säureglucosid	Bestrahlungsgemisch	<i>cis</i> -Säureglucosid
Gemessene Drehung α_D^{10} (2-dm-Rohr) (0.054 g Natriumsalz in 1 ccm Lösung)	—7.56°	—5.64°	—5.75°

4) Gehalt an freiem Cumarin: Cumarin ließ sich im Bestrahlungsgemisch zwar durch Geruch deutlich wahrnehmen, mit dem Diazoniumsalz des *p*-Nitranilins jedoch nur spurenweise durch weinrote Färbung nachweisen²²⁾. Daraus ist zu schließen, daß der Hydrolyseneffekt bei der Ultraviolett-Bestrahlung⁶⁾ hier nicht allzu bedeutend sein kann.

5) Gehalt an freier *o*-Cumarsäure: Die Anwesenheit von *o*-Cumarsäure verrät sich immer durch starke grüne Fluoreszenz in alkalischer Lösung¹⁹⁾²³⁾. Das Bestrahlungsgemisch zeigte in alkalischer Lösung (Natronlauge, Soda, Pottasche) nur spurenweise eine grüne Fluoreszenz.

6) Gehalt an Glucose: Die Glucosebestimmung wurde nach Bertrand durchgeführt. Die reine *trans*-Verbindung, die reine *cis*-Verbindung, *o*-Cumarsäure und Cumarin reduzieren Fehlingsche Lösung nicht. Für den rein präparativen Zweck, wie er hier befolgt werden sollte, wurde auf Blindbestimmungen verzichtet. Das Ergebnis würde dadurch auch nicht viel genauer werden; denn aus den Arbeiten von Guillaume und Tanret⁶⁾ geht hervor, daß die Bertrand-Methode zur Bestimmung der freien Glucose für Ultraviolett-Bestrahlungsgemische infolge schwer kontrollierbarer Sekundärreaktionen bei der Bestrahlung (Oxidationsvorgänge) gegenüber der polarimetrischen Glucosebestimmung 5—10% höher liegende Werte ergibt.

1 ccm *n*/₁₀-Kaliumpermanganat entspricht 6.36 mg Cu.

²²⁾ J. S. Clayton u. R. K. Larmour, C. 1936 I, 1334.

²³⁾ H. Ley u. R. Dreinhöfer, C. 1930 II, 1498.

Tafel 3.

Messung	Be-strahlungs-gemisch in ccm	Glucose bei 100 % Spaltung in mg	n_{10}^{Hg} -Per-manganat in ccm	Cu in mg	Glucose in mg	Spaltung in %
1	5	139.0	1.80	11.4	5.79	4.17
2	5	139.0	1.75	11.1	5.65	4.07
3	5	139.0	1.75	11.1	5.65	4.07
Mittel	—	—	—	—	—	4.1

7) Prozent-Umwandlung der *trans*-Form in die *cis*-Form: Die Bertrand-Bestimmungen zeigen, daß durch die Ultraviolett-Bestrahlung 4.1% des Glucosids gespalten und somit der Umwandlung entzogen worden sind. Setzt man diesen Befund in Rechnung, so ist es möglich, eine hinreichend genaue Aussage über den Prozentsatz der *trans-cis*-Umwandlung zu machen.

In 1 ccm Bestrahlungsgemisch sind 1.13 mg Glucose enthalten; dies entspricht einer Drehung von $\alpha_{\text{gluc.}}: + 0.12^\circ$ (im 2-dm-Rohr).

Durch Ultraviolett-Bestrahlung wurden 2.2 mg Glucosid der Umwandlung entzogen. (Es ist im Versuch nicht zu entscheiden, ob die Hydrolyse an der *trans*-Verbindung oder an der umgelagerten Verbindung geschieht; für die Berechnung ist dies gleichgültig.)

2.2 mg β -d-glucosido-*o*-cumarsaures Natrium entsprechen einer Drehung von $\alpha': - 0.30^\circ$ (im 2-dm-Rohr).

2.2 mg β -d-glucosido-cumarinsaures Natrium entsprechen einer Drehung von $\alpha'': - 0.23^\circ$ (im 2-dm-Rohr).

Tafel 4.

$\alpha_{\Delta \text{ tr.}}$ (gef.)	$\alpha_{\Delta \text{ tr.}} - \alpha'$ = $\alpha_{\Delta \text{ tr.}}$ (korrig.)	α_t (gef.)	$\alpha_t - \alpha_{\text{gluc.}}$ = α_t (korrig.)	$\alpha_{E \text{ cis}}$ (ber.)	$\alpha_{E \text{ cis}} - \alpha''$ = $\alpha_{E \text{ cis}}$ (korrig.)	$\alpha_{\Delta \text{ tr.}}$ (korrig.) — $\alpha_{E \text{ cis}}$ (korrig.)	$\alpha_{\Delta \text{ tr.}}$ (korrig.) — α_t (korrig.)	Um-wandlung %
-7.56°	-7.26°	-5.64°	-5.76°	-5.75°	-5.52°	-1.74°	-1.50°	86.2

Bedeutung der Zeichen:

$\alpha_{\Delta \text{ tr.}}$ (gef.) ... = gemessene Anfangsdrehung für die *trans*-Verbindung im 2-dm-Rohr,
 α' = siehe oben,

$\alpha_{\Delta \text{ tr.}}$ (korrig.) . = korrigierte Anfangsdrehung für die *trans*-Verbindung unter Berücksichtigung der Substrat-Hydrolyse (2-dm-Rohr),

α_t (gef.) = gemessene Drehung des Bestrahlungsgemisches nach $t = 6$ Tagen im 2-dm-Rohr,

$\alpha_{\text{gluc.}}$ = Drehung der durch Substrat-Hydrolyse frei gewordenen Glucose im 2-dm-Rohr (siehe oben),

α_t (korrig.) = korrigierte Drehung des Bestrahlungsgemisches unter Berücksichtigung der durch Substrat-Hydrolyse entstandenen Glucose (2-dm-Rohr),

$\alpha_{E \text{ cis}}$ (ber.) .. = berechnete Drehung für 100-proz. Umwandlung in die *cis*-Verbindung (2-dm-Rohr),

α'' = siehe oben,

$\alpha_{E \text{ cis}}$ (korrig.) . = Enddrehung für 100-proz. Umwandlung in die *cis*-Form unter Berücksichtigung der Substrat-Hydrolyse (2-dm-Rohr).

8) Salzbildung des Bestrahlungsgemisches: Es wurden in drei Versuchsreihen wäßrige Lösungen gleicher Konzentration der *trans*-Verbindung, *cis*-Verbindung und des Bestrahlungsgemisches unter ganz gleichen Bedingungen miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tafel 5 zusammengestellt:

Tafel 5.

Substrat-lösung +	<i>trans</i> -Verbindung	Bestrahlungsgemisch	<i>cis</i> -Verbindung
2-n. Salzsäure ..	schmale, farbl. Nadeln von Gluco- <i>o</i> -cumarsäure	—	—
AgNO ₃	weißer, mikrokrist. Niederschlag	geringe, amorphe, sich am Licht braunfärbende Abscheidung	—
Pb(NO ₃) ₂	schmale, farblose Nadeln	geringe Menge farbloser Nadelchen	—
ZnSO ₄	breite, farblose Nadeln	—	—
FeCl ₃	amorphe, braunrote Abscheidung	—	—
Hg ₂ (NO ₃) ₂	gallertartige, amorphe Fällung	—	—

Die Salzbildung des Bestrahlungsgemisches gleicht derjenigen der reinen *cis*-Verbindung. Eine Trennung von *cis*- und *trans*-Form ist über das in Wasser sehr schwer lösliche Bleisalz der *trans*-Verbindung möglich.

9) Vergleichend wurden in drei Versuchsreihen (Tafel 6) unter den üblichen Bedingungen¹⁾²⁾ die reine *trans*-Verbindung, die reine *cis*-Verbindung und das Bestrahlungsgemisch innerhalb 15 Stdn. bei 30° mit Emulsin gespalten.

In 3 ccm Spaltungsgemisch der *trans*-, *cis*- und Umlagerungsverbindung waren je 0.054 g Natriumsalz. Die Versuche wurden wegen der Cumarin-Isolierung mit dem doppelten Spaltungsansatz (E, Tafel 6) durchgeführt. Die Fermentlösung war etwa 1-proz.; Süßmandelemulsin-Rohferment vom β-Glucosidasewert 1.1; α_{Ferment} wurde berücksichtigt; α_A wurde durch Parallelversuch (A, Tafel 6) ohne Fermentlösung gemessen.

Das Bestrahlungsgemisch folgte der Spaltung der reinen *cis*-Verbindung. Aus 6 ccm der mit 0.4 g Pottasche abgestoppten Spaltungsgemische der reinen *cis*-Verbindung wurden durch Abkühlen auf 0° 0.0145 g Cumarin isoliert. Das Bestrahlungsgemisch ergab unter den ganz gleichen Bedingungen 0.0119 g Cumarin vom Schmp. 69° (korrig.).

Dieser Befund entspricht einer *trans-cis*-Umlagerung von 82%. Daß die Umlagerung nicht vollständig ist, geht bereits aus den polarimetrischen Messungen (Tafel 4) und den Versuchen über die vergleichende Salzbildung (Tafel 5) sowie aus der sehr deutlichen grünen Fluoreszenz (*o*-Cumarsäure) des alkalischen Spaltungsgemisches vom Bestrahlungsprodukt hervor (Tafel 6). Ferner zeigt die Vergleichsspaltung der reinen *trans*-Verbindung, daß Süßmandelemulsin an einer Cumarinbildung unbeteiligt ist.

Tafel 6.

Arbeitsgang, Reaktion und Befunde:	<i>trans</i> -Verbindung		Bestrahlungsprodukt		<i>cis</i> -Verbindung	
	A	E	A	E	A	E
ccm Substratlösung ..	4	4	4	4	4	4
ccm Wasser (W) bzw.						
ccm Fermentlös. (F)	2 (W)	2 (F)	2 (W)	2 (F)	2 (W)	2 (F)
Std. Spaltung bei 30°	15	15	15	15	15	15
Geruch nach Cumarin	Spur	deutlich	..	stark
Impfen mit Cumarin .	—	—	—	Krystallisation	—	Krystallisation
Farbe des Spaltungsgemisches	farblos, blank	farblos, trüb	farblos	gelb	farblos	hellgelb
Auf 0° abgekühlt	—	—	—	Krystallisation	..	Krystallisation
Std. bei 0° belassen .	6	6	6	6	6	6
+ 0.4 g K ₂ CO ₃ , 10 Min.						
bei 0°, Krystalle abgesaugt, m. 3 Tropfen Eiswasser gewaschen						
Isolierte Cumarinmenge	Kein Cumarin!			kurze, farblose Stäbchen	Kein Cumarin	lange, farblose Nadeln
Schmp. (korrig.)				0.0119 g		0.0145 g
Mischschmp. (korrig.) ..				68—69°		69—70°
Geschmack, Geruch ..				69—70°		70°
Farbe der alkalischen Lösg.	farblos	grüngelb	schwach	Cumarin	Cumarin	Cumarin schwach
Grüne Fluoreszenz ..	Spur	stark	gelb	tiefgelb	farblos	gelb deutlich
Fehling	—	+	(+)	stark	..	+
α_A (1 dm)	-1.28°	—	-1.03°	+	—	—
α_t (1 dm)	—	+0.46°	—	—	-1.06°	+0.04°
α_E (1 dm)	—	+0.49°	—	+0.06°	—	+0.49°
Spaltung in %	—	98.3	—	+0.49°	—	65.8
			71.7			

 β -d-Glucosido-hydro-*o*-cumarsäure.

2 g Glucosido-*o*-cumarsäure mit 1 Mol. Krystallwasser (0.0029 Mol.) wurden in 70 ccm absol. Methanol gelöst, mit 2 g Palladium/Barium-sulfat-Katalysator²⁴⁾ versetzt und bei 170/746 mm während 1/2 Stde. mit 74 ccm Wasserstoff hydriert¹⁸⁾¹⁹⁾²⁵⁾. Im Verlauf einer weiteren 1/2 Stde. wurde kein Wasserstoff mehr aufgenommen.

Wasserstoffverbrauch für 0°/760 mm: Ber. 65.0 ccm. Gef. 68.4 ccm.

Das Hydrierungsgemisch wurde vom Katalysator abgesaugt, mit Kohle geklärt und im Vakuum (40—45° Badtemperatur) zur Trockne verdampft. Krystalliner, farbloser Rückstand: 2 g.

Zur völligen Reinigung wurde 2-mal aus 96-proz. Äthanol durch Zugabe von absol. Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert: Etwa 2 g Rohprodukt wurden in 20 ccm gewöhnlichem Äthanol gelöst, mit 20—30 ccm absol. Tetra-

²⁴⁾ E. Schmidt, B. 52, 409 [1919].

²⁵⁾ Vergl. C. Paal u. H. Schiedewitz, B. 63, 766 [1930]; F. Tiemann u. H. Herzfeld, B. 10, 286 [1877]; K. Fries u. G. Fickewirth, A. 262, 35 [1908]; Tetralin G. m. b. H., Berlin, C. 1922 IV, 499.

chlorkohlenstoff verdünnt, über Kohlepapier geklärt und darauf mit 570 ccm absol. Tetrachlorkohlenstoff (Impfkrystalle!) in einem Guß versetzt. Die zuerst sich als farbloses Öl abscheidende Substanz krystallisierte alsbald in langen, manchmal in Rosetten angeordneten, seideglänzenden, farblosen Nadeln: 1.7 g.

Die Substanz ist sehr leicht löslich in Wasser, Methanol und Pyridin, leicht löslich in absol. Äthanol, *n*-Butanol, Dioxan und Eisessig und schwer löslich bis unlöslich in kaltem Aceton, Äther, kaltem Essigester, Benzol, Petroläther, Tetrachlorkohlenstoff und Chloroform. Die wäßrige Lösung von β -*d*-Glucosido-hydro-*o*-cumarsäure reagiert schwach kongosauer und ist von bitter-säuerlichem Geschmack. Die Substanz reagiert nicht mit soda-alkalischer Kaliumpermanganatlösung, während sie Bromlösung unter Bromwasserstoff-Bildung²⁸⁾ sofort entfärbt. Fehlingsche Lösung wird von der Substanz erst nach der Hydrolyse mit starken Säuren reduziert. Vor der sauren Hydrolyse zeigt die Substanz in alkalischer Lösung (Natronlauge) unter der Quarzlampe nur spurenweise eine grüne Fluorescenz, während diese nach der Hydrolyse stark positiv ist¹⁷⁾¹⁹⁾.

Für Analyse, Schmelzpunkt und Drehung wurde die aus Äthanol/Tetrachlorkohlenstoff umkristallisierte Substanz bei 2 mm/111° über Phosphorpentoxyd bis zur Konstanz getrocknet.

Die Substanz sintert bei 143—145° (korrig.) stark zusammen, um dann erst um 173° (korrig.) klar zu schmelzen.

$$[\alpha]_D^{20} = -2.79 \times 3.0792 / 2 \times 0.076 \times 1.008 = -56.1^\circ \text{ (in Wasser).}$$

5.453 mg Sbst.: 10.950 mg CO₂, 2.980 mg H₂O.

C₁₅H₂₀O₈ (328.16). Ber. C 54.85, H 6.14. Gef. C 54.77, H 6.11.

Untersuchungen an der Tonkabohne.

Die Untersuchungen wurden an den im Handel üblichen „rum-behandelten“¹⁶⁾ und unbehandelten Tonkabohnen durchgeführt.

Die behandelten braunen Tonkabohnen waren schon auf und unter ihrer Schale mit Cumarinkrystallen in Form von langen Nadeln bedeckt, rochen deutlich nach Cumarin und fluorescierten unter der Quarzlampe schwach grün. Der wäßrige Auszug dieser im Mörser zerkleinerten Bohnen zeigte ein pH von 6.0, in sodaalkalischer Lösung unter der Quarzlampe nur spurenweise grüne Fluorescenz und eine sehr starke Reaktion mit Fehlingscher Lösung. Dieser Auszug, sowie der Extraktionsrückstand der Bohnen, enthielten ein β -glucosidatisches Ferment, welches sich leicht bei der Einwirkung auf β -*d*-Glucosido-salicylsäure durch die bereits schon nach 15—30 Min. sehr deutliche Salicylsäure-Reaktion mit Ferrichlorid erkennen ließ. Die Extraktion mit Pottaschelösung ergab einen alkalischen Auszug, welcher unter der Quarzlampe sehr starke grüne Fluorescenz²⁴⁾ zeigte und Fehlingsche Lösung stark reduzierte. Diese rein qualitativen Befunde geben die Anwesenheit von freiem Cumarin, *o*-Cumarsäure, Zucker und einer β -Glucosidase in der Tonkabohne an.

Eingehender wurden die unbehandelten Tonkabohnen untersucht.

Die Bohnen stammten aus Brasilien (Ernte 1938) und wurden in einer Glas-Stöpselflasche bei 0° aufbewahrt. Sie waren rotbraun, zeigten keine Cumarin-Ausscheidung, hatten schwachen Cumaringeruch und einen aro-

²⁸⁾ Vergl. H. Hochstetter, A. 226, 360 [1884].

matisch-bitteren Geschmack. An Bruchstellen der Bohnen bildeten sich im Laufe der Zeit Nadeln von Cumarin aus.

Nachweis einer β -Glucosidase: Eine Bohne wurde unter Wasser im Mörser zerrieben. Die Aufschlämmung wurde geteilt, zu einem Teil Amygdalin gegeben, beide Proben gut verschlossen und bei Zimmertemperatur belassen. Nach einiger Zeit war in der Probe mit Amygdalin Blausäure deutlich durch Geruch wahrnehmbar.

Aceton-Extraktion: 12.5 g Bohnen (5 Stück) wurden im Mörser unter insgesamt etwa 250 ccm käuflichem Aceton (3-mal mit je 80 ccm) bei Zimmertemperatur von 20° verrieben. Das Ungleöste wurde abgesaugt und unter Aceton im Kühlschrank aufbewahrt, um die Wirkung des in ihm vorhandenen Ferments auszuschließen. Nach dem Verdampfen des blanken, farblosen Filtrats im Vakuum (40—45° Badtemperatur) verblieb ein hellgelbes Öl von bitterem, würzigem Geschmack und Cumaringeruch. Ausb. 5 g.

Mit Impfkrystallen, die sich an der Capillare gebildet hatten, wurde das Öl teilweise zur Krystallisation gebracht. Beim Aufbewahren im Kühlschrank erstarrte es zu einer festen Masse, die sich bei Zimmertemperatur teilweise wieder verflüssigte. Es wurde nun mit etwa 6 ccm absol. Petroläther versetzt; die Krystalle blieben ungelöst zurück. Nach dem Aufbewahren im Kühlschrank wurde von den langen, farblosen Nadeln abgesaugt. Ausb. 0.1 g¹⁴⁾ bei 2 mm/20° über Chlorcalcium getrocknet.

Die Krystalle waren in Schmp. — 67 bis 68° (korrig.) —, Mischschmelzpunkt — 68 bis 69° (korrig.) — und Eigenschaften identisch mit Cumarin.

Die Untersuchung des Tonkabohnenöls ist im Versuchsteil ausführlich beschrieben.

Das bei der Acetonextraktion ungelöst verbliebene und unter Aceton aufbewahrte Tonkabohnenmehl wurde abgesaugt. 6.0 g Ausbeute an lufttrocknem Mehl. (Das Filtrat hinterließ beim Verdampfen im Vakuum bei 40—45° keinen Rückstand.) Das Mehl schmeckte süß und ergab mit Fehlingscher Lösung eine stark positive Reaktion.

Methanol-Extraktion: 6 g mit käuflichem Aceton bei Zimmertemperatur (20°) erschöpfend ausgezogenes Tonkabohnenmehl wurden mit 160 ccm absol. Methanol aufgeschlämmt und unter häufigem Umschütteln 2 Tage bei Zimmertemperatur von 20° belassen. Nach dem Absaugen wurde das Ungleöste unter 100 ccm absol. Methanol aufbewahrt, und das gelbe Filtrat im Vakuum bei 40—45° Badtemperatur zur Trockne verdampft. 1.6 g eines braunen, amorphen, hygroskopischen Rückstandes.

Der Rückstand war gut löslich in Wasser, schmeckte süß und schwach würzig und ließ keinen Cumaringeruch erkennen. Die wäßrige Lösung reagierte lackmussauer; nach dem Impfen mit *o*-Gluco-cumarsäure trat keine Krystallisation ein; mit 2-n. Natronlauge gekocht, entwickelten sich Ammoniak und Amingeruch. Die wäßrige Lösung des Rückstandes reagierte mit sodaalkalischer Kaliumpermanganatlösung sofort, während Bromlösung von ihr erst nach einiger Zeit deutlich entfärbt wurde. Mit Fehlingscher Lösung trat bereits vor der Hydrolyse eine positive Reaktion ein, nach der Hydrolyse mit starker Salzsäure war die Reduktionswirkung unter den sonst gleichen Versuchsbedingungen stärker positiv. Dies deutet auf die Anwesenheit glycosidischer Substanzen im Methanolauszug hin.

Auf der Suche nach Cumarin, in glucosidischer⁴⁾⁷⁻¹³⁾ oder additiv gebundener⁴⁾⁷⁾¹³⁾¹⁷⁾¹⁹⁾ Form, sollten die folgenden, rein qualitativen Versuche 1 und 2 und die quantitative Versuchsreihe 3 Auskunft geben.

1) Der Rückstand des Methanolauszuges wurde in $n/5$ -Acetatpuffer vom $pH = 5.0$ gelöst und die Lösung auf 2 Proben gleichmäßig verteilt. Zu der einen Probe wurde Süßmandeleimulsin hinzugegeben. Beide Proben verblieben etwa 8 Stdn. im Thermostaten von 30° und noch 2 Tage bei Zimmertemperatur. Cumaringeruch war in beiden Proben nicht deutlich wahrnehmbar.

2) Die wäßrige Lösung des Rückstandes des Methanolauszuges zeigte unter der Quarzlampe eine schwache, blaugraue Fluorescenz; mit Natronlauge oder Sodalösung versetzt, trat eine geringe, aber deutliche grüne Fluorescenz auf. Nach 2 Min. Kochen mit 2-n. Natronlauge zeigte die erkaltete Lösung eine Verminderung der Fluorescenz. Bei Anwesenheit von nur Spuren Cumarin (frei oder additiv gebunden) hätte eine Verstärkung der grünen Fluorescenz eintreten müssen, wie infolge der Öffnung des δ -Lactonringes und der Bildung von *o*-Cumarsäure in Kontrollversuchen mit einem Kräställchen Cumarin zu beobachten war. Ebenso trat nach der Hydrolyse mit starker Salzsäure keine Verstärkung der Fluorescenz in natronalkalischer Lösung vor und nach dem Kochen ein — im Gegensatz zu den Vergleichsversuchen unter Zusatz einer Spur Cumarin.

Glykosidisch gebundenes Cumarin und anwesendes *o*-Cumarsäureglucosid hätten nach der Hydrolyse mit Salzsäure eine Fluorescenzverstärkung ergeben müssen.

3) 1.1 g Rückstand des Methanolauszuges wurde in 15 ccm Wasser gelöst und eine braune, trübe, schwach lackmussaure Lösung ohne Cumaringeruch und unter der Quarzlampe ohne grüne Fluorescenz erhalten.

a) Nach dem Ausziehen dieser Lösung mit 3-mal je 15 ccm Äther und Verdampfen des Äthers im Vakuum ($30-40^{\circ}$) wurde ein geringer Abdampfrückstand gewonnen, aus welchem sich neben *o*-Cumarsäure durch nochmalige Extraktion seiner wäßrig-sodaalkalischen Lösung mit Äther eine Spur freies Cumarin in farblosen Nadeln isolieren ließ. *o*-Cumarsäure wurde durch Impfen der wäßrigen Lösung mit *o*-Cumarsäurekrystallen, an der starken grünen Fluorescenz der sodaalkalischen und ammoniakalischen Lösung¹⁹⁾²³⁾ unter der Quarzlampe, an der Reaktion mit sodaalkalischer Kaliumpermanganatlösung und der Entfärbung von Brom-Lösung erkannt. Cumarin ließ sich durch Geruch und Geschmack nachweisen. Fehlingsche Lösung wurde von dem Abdampfrückstand vor und nach der Hydrolyse nicht reduziert.

b) Die mit Äther ausgeschüttelte, wäßrige Lösung des Rückstandes des Methanolauszuges wurde mit 4 ccm etwa 2-n. Ammoniaklösung versetzt und 3 Tage bei Zimmertemperatur belassen. Unter der Quarzlampe zeigte die ammoniakalische Lösung eine starke grüne Fluorescenz. Nun wurde 3-mal mit je 15 ccm Äther ausgezogen und die neutrale Ätherlösung bei Zimmertemperatur in einer Krästallisierschale verdampft.

Sehr geringer Rückstand, keine Krystalle, Geruch nach Cumarin, mit Ammoniak keine grüne Fluorescenz unter der Quarzlampe.

Cumarin konnte also in nennenswerter Menge nicht additiv oder salzartig an *o*-Cumarsäure¹⁹⁾, Hydro-*o*-cumarsäure⁴⁾⁷⁾¹³⁾¹⁷⁾, β -*d*-Glucosido-*o*-cumarsäure oder β -*d*-Glucosido-hydro-*o*-cumarsäure⁷⁾ gebunden vorliegen.

c 1) Die mit Ammoniak behandelte, wäßrige Lösung des Rückstandes der Methanol-Extraktion wurde mit 12 ccm etwa 2-*n*. Schwefelsäure versetzt und sofort 4-mal mit je 15 ccm Äther ausgezogen. Die Ätherlösung hinterließ einen sehr geringen Rückstand, welcher sich nach seinen Eigenschaften als *o*-Cumarsäure erwies.

c 2) Die wäßrig-schwefelsaure Lösung wurde etwa 3 Tage bei Zimmer-temperatur aufbewahrt und darauf 3-mal mit je 15 ccm Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung hinterließ nach dem Eindunsten nur eine Spur Rückstand.

c 3) Nach 2-stdg. Kochen am Rückflußkühler wurde die braune, etwas trüb gewordene schwefelsaure Lösung 3-mal mit je 20 ccm Äther ausgezogen. Der Verdampfungsrückstand, der an SO₄-Ionen freien, schwach lackmussauren, leicht bräunlichen Ätherlösung war gering, hatte honigartigen Geruch, war leicht löslich in Ammoniak (also kein Cumarin!) und zeigte in ammoniakalischer Lösung unter der Quarzlampe grüne Fluorescenz.

c 4) Nach Hinzufügen von 1.7 ccm 95.6-proz. Schwefelsäure (*d* 1.84) wurde die nun etwa 2.5-*n*. Schwefelsäure-Lösung nochmals 1½ Stdn. am Rückflußkühler gekocht, wobei sie eine tiefer-braune Farbe annahm. Durch Ätherextraktion wurde eine geringe Menge eines braunen, von SO₄-Ionen freien Sirups von honigartigem Geruch gewonnen, der in wäßriger Lösung lackmussauer reagierte und sowohl ohne als auch mit Ammoniak unter der Quarzlampe gelbgrün fluorescierte.

Cumarin war weder durch Extraktion mit Petroläther zu gewinnen, noch am Geruch oder Geschmack zu erkennen.

Die Hydrolysenversuche mit Schwefelsäure zeigten eindeutig, daß Cumarin im Methanol-Extrakt der Tonkabohnen nicht glykosidisch gebunden vorkommt.

Untersuchungen an mit Aceton und anschließend mit Methanol extrahiertem Tonkabohnenmehl.

Das bei der Methanol-Extraktion ungelöst gebliebene, unter Methanol aufbewahrte Tonkabohnenmehl wurde abgesaugt. 3.9 g bei 2 mm/Zimmer-temperatur über Blaugel getrocknetes Mehl wurden gewonnen. (Das Filtrat hinterließ nach dem Verdampfen im Vakuum bei 40—45° Badtemperatur einen geringen, braunen, Fehlingsche Lösung stark reduzierenden Rückstand.)

Mit heißem Wasser ausgezogen, wurde ein Filtrat gewonnen, das schwach lackmussauer reagierte, praktisch geschmack- und geruchlos war, Fehlingsche Lösung erst nach der Hydrolyse mit Säuren reduzierte, sodaalkalische Kaliumpermanganat- und Bromlösung entfärbte und vor sowie nach der Hydrolyse unter der Quarzlampe in natronalkalischer Lösung erhitzt oder nicht erhitzt (vergl. oben) praktisch nicht fluorescierte, während die Vergleichsprobe mit einer Spur Cumarin unter den ganz entsprechenden Bedingungen starke grüne Fluorescenz zeigte.

Die gleichen Befunde ergaben Untersuchungen am Mehl selbst. Cumarin ließ sich auch darin nicht nachweisen durch Einwirkung von 2-*n*. Ammoniaklösung, 2-*n* Salzsäure und Emulsin in *n*/₅-Acetatpuffer vom pH 5.0 bei 30° und Zimmertemperatur. Bei Erwärmung des Mehls mit Natronlauge entwickelte sich Ammoniak (aus Eiweißsubstanzen!).

Vergleich von unbehandelten und „rum-behandelten“¹⁰⁾ Tonkabohnen.

1) Unbehandelte Tonkabohnen: 24.15 g Tonkabohnen (10 Stück) wurden, wie oben beschrieben, mit insgesamt etwa 500 ccm käuflichem Aceton ausgezogen und aufgearbeitet.

Ausbeute an hellgelbem Tonkabohnenöl: 9.4 g; bei 14 mm/45—50° über Chlorcalcium getrocknet.

Ausbeute an Tonkabohnenmehl: 12.3 g; bei 2 mm/Zimmertemperatur über Blaugel und Chlorcalcium getrocknet.

Das hellgelbe, würzig riechende Öl wurde mit 24 ccm absol. Petroläther versetzt, mit Cumarin geimpft und 16 Stdn. im Kühlschrank belassen. Es war Krystallisation in langen, farblosen Nadeln eingetreten, die eiskalt abgesaugt und mit wenig Petroläther gewaschen wurden. Ausb. 0.28—0.3 g¹⁴⁾ bei 2 mm/Zimmertemperatur über Blaugel und Chlorcalcium getrocknet. Schmp. 67—68° (unkorr.). Die Krystalle erwiesen sich im Geruch, Geschmack und Mischschmelzpunkt identisch mit Cumarin.

Die Mutterlauge wurde im Vakuum (45—50°) abgedampft und das verbleibende, hellgelbe Öl bei 17 mm/50—55° über Chlorcalcium getrocknet. Ausb. 8.7 g.

Die Untersuchung des Tonkabohnenöls ist weiter unten ausführlich beschrieben.

2) „Rum-Behandlung“ der Tonkabohnen¹⁰⁾: 24.15 g Tonkabohnen (10 Stück) wurden 24 Stdn. unter 50 ccm Äthanol von 60 Vol.-% im Dunkeln aufbewahrt. Danach wurde die braune Äthanollösung abgegossen und die stark gequollenen Bohnen einen Tag an der Luft liegengelassen.

Bohnengewicht 25 g. Cumarinkristalle zeigten sich nicht an der Oberfläche der Bohnen.

Nach dem Klären mit Kohle wurde die Äthanollösung im Vakuum (45—50°) zur Trockne verdampft. 0.3 g eines braunen, sirupösen, mit Kristallen durchsetzten Rückstandes (bei 20 mm/50° über Chlorcalcium getrocknet).

Er besaß honigartigen Geruch und auf der Zunge brennenden, cumarinartigen Geschmack. Beim Lösen in Wasser blieben Cumarinkristalle (etwa 20 mg) ungelöst zurück. Die wäßrige Lösung reagierte schwach lackmussauer, reduzierte Fehlingsche und sodaalkalische Kaliumpermanganatlösung sofort und zeigte vor und nach der Hydrolyse mit Salzsäure in natronalkalischer Lösung unter der Quarzlampe gleichartige, nur schwachgrüne Fluoreszenz. Der letztere Befund zeigt, daß im Äthanolextrakt keine Substanz vorhanden ist, die Cumarin glucosidisch gebunden enthält.

Die lufttrocknen Bohnen wurden, wie unter 1) beschrieben, mit Aceton extrahiert und aufgearbeitet.

Ausbeute an hellgelbem Tonkabohnenöl: 9.8 g; bei 14 mm/45—50° über Chlorcalcium getrocknet.

Ausbeute an Tonkabohnenmehl: 11.4 g; bei 2 mm/Zimmertemperatur über Blaugel und Chlorcalcium getrocknet.

Aus dem Öl ließen sich, wie unter 1) beschrieben, 0.3 g (einschließlich der 0.02 g aus dem Äthanolextrakt) Cumarin in langen, farblosen Nadeln gewinnen. Schmp. 66—68° (unkorr.); Mischschmelzpunkt mit Cumarin 67—68° (unkorr.).

Nach dem Verdampfen der Mutterlauge im Vakuum bei 45—50° Badtemperatur wurden 9.3 g hellgelbes Öl gewonnen (bei 13 mm/45—50° über Chlorcalcium getrocknet).

Diese Versuche zeigen, daß die „Rum-Behandlung“ der Tonkabohnen keinen Einfluß auf die Ausbeute des durch Aceton extrahierbaren Cumarins hat.

Untersuchungen an Tonkabohnenöl: Die Untersuchungen wurden sowohl an dem Öl der unbehandelten als auch der „rum-behandelten“ Bohnen durchgeführt und übereinstimmend gefunden.

Das Öl erstarrt im Kühlschrank, um sich bei Zimmertemperatur wieder zu verflüssigen. Beim Stehenlassen scheidet sich aus dem Öl eine geringe Menge weißer, amorpher Substanz aus, deren wäßrige Lösung Fehlingsche Lösung reduziert. Das Öl ist leichter als Wasser, worin es unlöslich ist. Die Emulsion reagiert neutral gegen Lackmus. Es riecht stark nach Cumarin. Mit kalter Natronlauge geschüttelt, zeigt sich unter der Quarzlampe eine schwach-grüne Fluorescenz, welche auch nach dem Kochen mit Natronlauge nicht intensiver wird. Beim Kochen mit Wasser und verd. Salzsäure tritt ein angenehmer eigentümlicher Geruch auf (Riechstoff?); beim Kochen mit Natronlauge tritt Schäumen und seifenartiger Geruch auf. Nach dem Abkühlen der alkalischen Flüssigkeit erstarrt das Öl und nimmt wachsartige Konsistenz an. Fehlingsche Lösung wird von Öl vor und nach der Behandlung mit Säuren nicht reduziert. Sodaalkalische Kaliumpermanganatlösung und Brom-Lösung werden von ihm augenblicklich entfärbt.

**Prüfung auf den Anteil des Verseifbaren im Tonkabohnenöl
(orientierender Versuch).**

20 Tropfen vom Tonkabohnenöl wurden mit 20 Tropfen 50-proz. Natronlauge und etwa 3 ccm gewöhnl. Alkohol versetzt und längere Zeit gekocht. Es trat völlige Lösung ein. Nach dem weitgehendsten Abdampfen des Äthanols wurde der beim Abkühlen erstarrte Rückstand in der 5- bis 6-fachen Menge heißem Wasser gelöst. Beim Erkalten nahm die Lösung gallertartigen Charakter an. Bei weiterem Verdünnen mit kaltem Wasser löste sich alles sofort auf, und es entstand eine stark schäumende Lösung von seifenartigem Geruch. Diese wäßrig-alkalische Lösung mit verd. Salzsäure im Überschuß versetzt, bildete eine Emulsion des sich abscheidenden Öls. Als bald zeigten sich Öltröpfchen an der Flüssigkeitsoberfläche (Verseifung!). Beim Kochen dieser sauren Lösung trat der angenehme, eigentümliche Geruch wieder auf (Riechstoff?). Die Extraktion der wäßrig-alkalischen Lösung mit Petroläther ergab nur Spuren von Unverseifbarem.

Zusammenfassung.

1) Es gelingt, die beiden stereoisomeren Formen der *o*-Oxyzimtsäure- β -d-glucoside ineinander überzuführen und die als in der Natur vorkommend beschriebene β -d-Glucosido-hydro-*o*-cumarsäure aufzubauen.

2) Cumarin ist aus den reifen, unbehandelten Tonkabohnen leicht und vollständig mit Aceton extrahierbar.

3) Die „Rum-Behandlung“ hat auf die Cumariausbeute keinen Einfluß; sie dient im Handel höchstwahrscheinlich nur dazu, um das Cumarin an der Oberfläche der Bohnen beim Verdunsten des Alkohols sichtbar zu machen.

4) Ein Glucosid, wie β -d-Glucosido-cumarinsäure oder einer ihrer Ester, läßt sich in der Tonkabohne nicht auffinden oder nachweisen.

5) Neben Cumarin wurde *o*-Cumarsäure in der Tonkabohne erkannt.

6) Das Tonkabohnenöl hat ungesättigten Charakter, ist verseifbar und enthält anscheinend einen Riechstoff, welcher dem Cumarin aus Tonkabohnen geruchlich seinen besonderen Charakter verleiht.

7) Es wird eine Methode beschrieben, um das Cumarin in geringsten Spuren durch grüne Fluorescenz unter der Quarzlampe nachzuweisen.