

236. Über Inhaltsstoffe von *Crataegus oxyacantha* L.

II. Mitteilung¹⁾.

β -Sitosterin und Oleanolsäure

von Th. Bersin und A. Müller.

(15. VIII. 52.)

Die von *Baechler*²⁾ aus dem Ätherextrakt von Weissdornbeeren (*Crataegus oxyacantha* L.) isolierte „Crataegussäure“ $C_{32}H_{52}O_4$ erwies sich im Verlaufe neuerer Untersuchungen als ein Gemisch. *Ullsperger*³⁾ trennte dieses weisse amorphe Pulver (Smp. 261—264°) in die beiden Komponenten „Körper A“ und „Körper C“ auf. Dabei wurde der „Körper A“ (Smp. 278°) kristallin erhalten, während der bei 241—242° schmelzende „Körper C“ nicht in reiner Form gefasst werden konnte. *Schindler*⁴⁾ versuchte nach Entfernung des wasserlöslichen Anteils die „Crataegussäure“ auf Grund der verschiedenen Löslichkeit in Alkohol aufzutrennen. Die erhaltenen Komponenten bezeichnete er als „Crataegus- α -Sapogenin“ (Smp. 279°) und „Crataegus- β -Sapogenin“ (Smp. 218—220°). Wir fanden nun, dass es sich beim „Crataegus- α -Sapogenin“ (= „Körper A“) um die Monooxytriterpencarbonsäure Ursolsäure¹⁾ handelt, die den Hauptanteil der „Crataegussäure“ bildet. „Crataegus- β -Sapogenin“ konnte von *Schindler* nicht in reiner Form gefasst werden; er konnte aber aus diesem bei 218—220° schmelzenden Anteil Derivate herstellen, die mit den entsprechenden Derivaten der Oleanolsäure (Smp. 305—306°) keine Schmelzpunktserniedrigung gaben. Damit war auch die Uneinheitlichkeit von „Crataegus- β -Sapogenin“ angezeigt.

Kurze Zeit später berichteten *Tschesche & Fugmann*⁵⁾ über die Isolierung einer Triterpencarbonsäure „Crataegolsäure“ (Smp. 252—254°), die sie als 2,19-Dioxy- $\Delta^{13,18}$ -ursancarbonsäure-(17) ansahen. Es zeigte sich jedoch im Verlaufe unserer Auftrennung von „Crataegussäure“, dass sowohl „Crataegolsäure“ als auch *Ullsperger*'s „Körper C“ ebenfalls keine einheitlichen Substanzen sind.

Nach Abtrennung des wasserlöslichen Anteils wurde die „Crataegussäure“ mit 50-proz. Alkohol extrahiert und die lösliche Substanz über das Kaliumsalz gereinigt. Im Neutralteil konnte β -Sitosterin nachgewiesen werden. Die Säure zeigte sämtliche von

¹⁾ I. Mitt.: *Th. Bersin & A. Müller*, *Helv.* **34**, 1868 (1951).

²⁾ *L. Baechler*, Diss. Basel 1927.

³⁾ *R. Ullsperger*, *Pharm.* **6**, 141 (1951).

⁴⁾ *H. Schindler*, *Arch. Pharm.* **284**, 132 (1951).

⁵⁾ *R. Tschesche & R. Fugmann*, *B.* **84**, 810 (1951).

Schindler (l. c.) für „Crataegus- β -Sapogenin“ beschriebenen Eigenschaften und ergab, nach Abtrennung einer benzollöslichen Substanz¹⁾, eine bei 261—263° schmelzende benzolunlösliche Säure. Daraus konnte durch Acetylierung und nachfolgende Veresterung mit Diazomethan Acetyl-oleanolsäure und deren Methylester gewonnen werden.

Die in 50-proz. Alkohol unlösliche Substanz (Smp. 267—269°) wurde durch fraktionierte Kristallisation aus Feinsprit in die schwerlösliche Ursolsäure und leichtlösliche Oleanolsäure aufgetrennt. Mehrere Mischfraktionen zeigten mit „Crataegolsäure“ keine Schmelzpunktserniedrigung. Ein künstlich hergestelltes Gemisch aus 4 Teilen Ursolsäure und 1 Teil Oleanolsäure schmolz bei 260—262°; diese Probe zeigte mit der „Crataegolsäure“ von *Tschesche & Fugmann* einen Mischschmelzpunkt von 260—262°²⁾. Die kristallisierte Oleanolsäure, $C_{30}H_{48}O_3$, Smp. 305—306°, führten wir nach Acetylierung und Methylierung mit Diazomethan in den bekannten Acetyl-oleanolsäure-methylester ($C_{33}H_{52}O_4$, Smp. 217—218°) über.

Nach Abtrennen der sauren Anteile aus den Mutterlaugen der rohen „Crataegussäure“³⁾ und nachfolgender chromatographischer Reinigung der Neutralteile konnte β -Sitosterin, $C_{29}H_{50}O + H_2O$, Smp. 139—140° isoliert werden. Dessen Menge hängt von der Art der Aufarbeitung ab. Durch Digitonin-Ausfällung der Neutralteile und nachfolgende Acetylierung wurde β -Sitosterin-acetat (Smp. 120—121°) hergestellt.

Die wässrigen Lösungen der Natriumsalze von Ursolsäure, Oleanolsäure, bzw. der benzollöslichen Säure¹⁾ zeigten, im Gegensatz zu den Angaben von *Ullsperger*⁴⁾, in unserer Versuchsanordnung keine Herzwirkung.

Experimenteller Teil⁵⁾.

Isolierung von β -Sitosterin. Die gelben Mutterlaugen der rohen „Crataegussäure“⁶⁾ wurden im Vakuum eingengt, in Äther aufgenommen und mit verdünnter Natronlauge ausgeschüttelt. Nach Neutralwaschen der ätherischen Lösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Filtrat eingengt. Als Rückstand verblieb eine braune, schmierige Masse. Diese Substanz wurde in wenig Petroläther-Benzol (4:1) gelöst und an eine mit Petroläther eingeschlammte Säule aus Aluminiumoxyd (*Merck*) adsorbiert. Elution mit Petroläther (30—60°) lieferte farblose, derbe Nadeln vom Smp. 113°. Die

1) Die benzollösliche Fraktion wurde noch nicht näher untersucht.

2) Wir danken Herrn Prof. Dr. R. *Tschesche*, Hamburg, bestens für eine Probe „Crataegolsäure“. Das Präparat zeigte einen Smp. von 261—263°.

3) Bei der Titration dieser Substanz fanden wir ein Äquiv.-Gew. von 515 [*Helv.* **34**, 1870 (1951)], während sich für Triterpencarbonsäuren $C_{30}H_{48}O_3$ ein Äquiv.-Gew. von 456,68 berechnet. Diese Differenz zwischen gefundenem und berechnetem Äquiv.-Gew. aus roher „Crataegussäure“ erklärt sich durch das Vorhandensein des Neutralstoffes β -Sitosterin.

4) R. *Ullsperger*, *Pharm.* **7**, 211 (1952); vgl. M. *Ishidate* und Mitarb., *Chem. Abstr.* **45**, 9068 (1951).

5) Alle Smp. sind korrigiert und im evakuierten Röhrchen bestimmt.

6) Vgl. I. Mitt.

Substanz zeigte mit Tetranitromethan keine Färbung. Die Petrolätherfraktion wurde nicht näher untersucht. Petroläther-Benzol-Gemische (9:1, 4:1, 3:1, 1:1) eluierten ein orangefarbiges, methanolunlösliches Öl¹⁾. Das Benzol-Eluat ergab eine schwach gelbliche Fraktion, aus welcher farblose Nadeln vom Smp. 136–136,5° kristallisierten. Benzol-Äther-Gemische eluierten ein gelbliches Öl, das noch nicht näher untersucht wurde.

Nach Umkristallisieren der Benzolfraktion aus Methanol schmolz das Sterin (farblose, monokline Blättchen) bei 139–140°; $[\alpha]_D^{24} = -34^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,00$ in Chloroform)²⁾. Zur Analyse wurde bei 70° Badtemperatur im Hochvakuum sublimiert.

2,417 mg Subst. gaben 7,129 mg CO₂ und 2,600 mg H₂O

C₂₅H₅₀O + H₂O Ber. C 80,49 H 12,11% Gef. C 80,49 H 12,04%

Die Farbreaktionen nach *Liebermann-Burchard* und nach *Salkowsky* sind positiv. Mit Benzaldehyd (0,05 bis 0,2 cm³ 1-proz. alkohol. Lösung) gibt das Sterin beim Unterschichten mit konz. Schwefelsäure folgende für Sitosterin typische Reaktion³⁾: dunkelorange, von violetterm Ring durchzogen, Fluoreszenz grün. β -Sitosterin aus Crataegus (10-proz. Lösung in Chloroform) bildet mit der stöchiometrischen Menge 60-proz. Perchlorsäure ein farbloses, kristallines „Sterolium“-Salz, welches mit überschüssiger Säure in eine purpurrote, halochrome Verbindung übergeht⁴⁾.

β -Sitosterinacetat. 1. Ansatz: 50 mg β -Sitosterin vom Smp. 139° (Benzoleluat aus oben beschriebenem Chromatogramm) wurden in 50 cm³ reinstem Pyridin gelöst und mit 30 cm³ frisch destilliertem Acetanhydrid versetzt. Nach üblicher Aufarbeitung und Kristallisation aus Methanol zeigte das Derivat den Smp. 120–121°.

2. Ansatz: Das rohe Sterin — verunreinigt mit dem anhaftenden gelben Farbstoff — wurde in wenig absolutem Alkohol nach längerem Stehen mit Digitonin ausgefällt und das Digitonid mit ca. 5 cm³ Essigsäureanhydrid 10 Min. zum Sieden erhitzt. Die noch heisse Lösung wurde mit dem vierfachen Volumen 50-proz. Alkohol verdünnt und die abgekühlte Lösung vom ausgeschiedenen Acetat filtriert. Feine, weisse Nadelchen; nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol Smp. konstant bei 120–121°. Zur Analyse wurde 2 Std. im Hochvakuum bei 70° Badtemperatur getrocknet.

4,011 mg Subst. gaben 11,963 mg CO₂ und 4,092 mg H₂O

C₃₁H₅₂O₂ Ber. C 81,52 H 11,48% Gef. C 81,39 H 11,42%

Liebermann-Burchard'sche Reaktion: sehr kurz rote, intensiv violette, dann blaugrüne und beständig smaragdgrüne Farbe⁵⁾.

Bei der Chromatographie der Mutterlaugen aus acetylierter, roher „Crataegussäure“⁶⁾ konnte ebenfalls Sitosterinacetat (Smp. 120–121°) isoliert werden. Die Mischprobe mit dem oben beschriebenen Derivat ergab keine Schmelzpunktsdepression.

Aufarbeitung des Triterpencarbonsäuregemisches „Crataegussäure“ aus *Crataegus oxyacantha* L. Als Ausgangsmaterial diente das durch Umlösen aus Essigester erhaltene Gemisch „Crataegussäure“ vom Smp. 264–266,5°⁶⁾. Zur Entfernung von wasserlöslichen Substanzen wurden 50 g „Crataegussäure“ erschöpfend mit Wasser ausgekocht. Der Rückstand wurde zweimal mit je 500 cm³ 50-proz. Alkohol 1 Std. unter Rückfluss gekocht und nach Abkühlen filtriert. Dabei resultierten 45,8 g ungelöstes, weisses Pulver (Smp. 267–269°), während 4,162 g Säure im Filtrat vorlagen. Der Filtrationsrückstand (45,8 g) wurde in 2,5 l heissem 96-proz. Alkohol gelöst, die schwach gelbliche Lösung mit wenig Aktivkohle entfärbt und heiss filtriert. Aus dem Filtrat kristallisierten 15,2 g Ursolsäure vom Smp. 284–285°⁶⁾. Durch sukzessives Eindampfen der Mutter-

¹⁾ Diese Fraktionen ergaben mit Antimontrichlorid die für Carotinoide typische Farbreaktion.

²⁾ Vgl. *St. W. Gloyer & H. A. Schuette*, Am. Soc. **61**, 1901 (1939); *J. D. Bernal, D. Crowfoot & I. Fankuchen*, Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. A. **239**, 135 (1940).

³⁾ Vgl. *I. Scherrer*, Helv. **22**, 1329 (1939).

⁴⁾ *W. Lange, R. G. Folzenlogen & D. G. Kolp*, Am. Soc. **71**, 1733 (1949).

⁵⁾ Vgl. *H. Staub*, Helv. **25**, 666 (1942).

⁶⁾ Vgl. *I. Mitt.* Helv. **34**, 1868 (1951).

lauge erhielten wir mehrere Mischfraktionen (insgesamt 19,98 g), deren Smp. zwischen 259 und 269° variierten. Aus der letzten, ca. 200 cm³ messenden Mutterlauge kristallisierten 1,06 g Oleanolsäure in Form von glänzenden, schön ausgebildeten Nadeln; Smp. nach Umkristallisieren aus Alkohol 305—306°; $[\alpha]_D^{25} = +78^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,00$ in Chloroform¹⁾).

41,9 mg Oleanolsäure in 25 cm³ Alkohol verbrauchten direkt 0,93 cm³ 0,1-n. alkohol. KOH (Phenolphthalein).

$C_{30}H_{48}O_3$ Äquiv.-Gew. Ber. 456,68 Gef. 450,5

Zur Analyse wurde 5 Std. bei 140° im Hochvakuum (10⁻⁵ mm) getrocknet.

3,651 mg Substanz gaben 10,526 mg CO₂ und 3,510 mg H₂O

$C_{30}H_{48}O_3$ Ber. C 78,89 H 10,59% Gef. C 78,68 H 10,76%

Acetyl-oleanolsäure: 200 mg Oleanolsäure wurden in ca. 150 cm³ reinstem Pyridin gelöst und mit 50 cm³ frisch destilliertem Acetanhydrid versetzt. Nach 24stündigem Stehenlassen und üblicher Aufarbeitung erhielten wir 211 mg Rohacetat. Nach Umkristallisieren aus Alkohol Smp. bei 260—261°; mit authentischer Acetyl-oleanolsäure keine Smp.-Erniedrigung²⁾.

Oleanolsäure-methylester: 200 mg Oleanolsäure (Smp. 305—306°) wurden in 50 cm³ Äther-Methanol (2:1) gelöst und mit 1,8 Mol. Diazomethan über Nacht verestert. Aus Alkohol farblose Nadeln, Smp. 198—199°³⁾.

Acetyl-oleanolsäure-methylester: 100 mg Acetyl-oleanolsäure wurden in 50 cm³ Äther-Methanol (2:1) gelöst und mit 1,8 Mol. einer ätherischen Diazomethan-Lösung versetzt. Nach üblicher Aufarbeitung und Kristallisation aus Alkohol zeigte das Derivat den konstanten Smp. 217—218°; mit authentischem Acetyl-oleanolsäure-methylester keine Smp.-Depression²⁾.

Zur Analyse wurde bei 130° im Hochvakuum während 4 Stunden getrocknet.

3,928 mg Substanz gaben 11,130 mg CO₂ und 3,640 mg H₂O

$C_{33}H_{52}O_4$ Ber. C 77,29 H 10,22% Gef. C 77,33 H 10,37%

Die Aufarbeitung des Filtrates (50-proz. alkoholische Lösung aus „Crataegussäure“) ergab 4,162 g weisses Pulver vom Smp. 209—213°. Diese Substanz wurde in 1 l Äther gelöst und zur Abtrennung der sauren Anteile 6mal mit 2-n. KOH (insgesamt 720 cm³) ausgeschüttelt. Das in der alkalischen Lösung suspendierte Kaliumsalz wurde abfiltriert und das Filtrat nach Ansäuern mit verd. H₂SO₄ (Kongo) mit Äther extrahiert. Das abfiltrierte Kaliumsalz wurde in wässriger Suspension mit verd. H₂SO₄ zerlegt und die freie Säure in Äther aufgenommen. Nach Neutralwaschen der vereinigten ätherischen Lösungen wurde mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Die sauren Anteile wurden in Alkohol gelöst und die gelbliche Lösung mit wenig Aktivkohle entfärbt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels verblieben 3,6 g weisses Pulver vom Smp. 220—223°⁴⁾. Die Aufarbeitung der Neutralteile ergab 0,34 g bräunliches Öl, welches nach kurzer Zeit erstarrte. Diese Substanz zeigte mit Benzaldehyd-Schwefelsäure die für Siotosterin typische Farbreaktion⁵⁾.

Die bei 220—223° schmelzende Säure wurde in 50 cm³ Benzol unter Rückfluss gekocht und anschliessend von ungelösten Anteilen filtriert. Der benzollösliche Trocken-

¹⁾ Vgl. W. A. Jacobs & E. E. Fleck, J. Biol. Chem. **96**, 341 (1932); R. Nuccorini, Ann. Sperim. agrar. Pisa **17**, 21 (1935); C. 1936 I, 3931.

²⁾ Wir danken Herrn P.-D. Dr. O. Jeger, Organ.-Chem. Laboratorium der ETH., bestens für die Überlassung einer Probe Acetyl-oleanolsäure-methylester, sowie Herrn K. H. Eberhardt, Institut für Lebensmittelchemie und Pharmazie der Universität München, für eine Probe Acetyl-oleanolsäure.

³⁾ Vgl. W. A. Jacobs & E. E. Fleck, J. Biol. Chem. **96**, 341 (1932).

⁴⁾ Diese Substanz dürfte mit dem von H. Schindler, Arch. Pharm. **284**, 132 (1951), beschriebenen „Crataegus-β-Sapogenin“ identisch sein.

⁵⁾ I. Scherrer, Helv. **22**, 1329 (1939).

rückstand wurde über Aluminiumoxyd (*Merck*) chromatographiert. Mit Benzol konnten 170 mg bräunliches Öl eluiert werden. Die Substanz zeigte Säurecharakter, ist schwerlöslich in Alkohol, löslich in Benzol, leicht löslich in Äther und unlöslich in Petroläther. Sie wurde nicht weiter untersucht.

Die benzolunlösliche Säure schmolz bei 261–263°. Daraus wurde durch Acetylierung bzw. Acetylierung und nachfolgende Veresterung mit Diazomethan Acetyloleanolsäure bzw. Acetyl-oleanolsäure-methylester erhalten.

Herrn *H. Evelbauer*, Rio de Janeiro, danken wir für tätige Mithilfe. Die Mikroanalysen wurden in der Mikroanalytischen Abteilung der Organ.-Chem. Anstalt der Universität Basel (Leitung: Herr *E. Thommen*) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Ausser Ursolsäure wurden aus der sogen. „Crataegussäure“ β -Sitosterin und Oleanolsäure isoliert. Die neuerdings in der Literatur beschriebenen Substanzen „Körper C“, „Crataegus- β -Sapogenin“ und „Crataegolsäure“ sind keine einheitlichen Verbindungen. „Körper A“ und „Crataegus- α -Sapogenin“ sind identisch mit Ursolsäure.

Forschungsabteilung
der Laboratorien *Hausmann AG.*,
St. Gallen.

237. Zur Kenntnis der interferometrischen Aufzeichnung von Brechungsindex-Gradienten.

8. Mitteilung über Elektrophorese¹⁾

von **E. Wiedemann.**

(20. VIII. 52.)

In einer vorangegangenen Arbeit über den gleichen Gegenstand war ein Überblick über die in den letzten Jahren in Anwendung gelangten Methoden zur interferometrischen Aufzeichnung des Verlaufs von Brechungsindexgradienten gegeben worden, wie sie bei Elektrophorese-, Diffusions- und Ultrazentrifugen-Messungen Verwendung finden können. Dabei war zu zeigen, dass Interferometer-Anordnungen nach *Rayleigh* aus verschiedenen Gründen solchen nach *Jamin* überlegen sind. Sie lassen sich zum Beispiel nach *H. Svensson*²⁾ mit der optischen Anordnung zur Erzeugung von Diagrammaufnahmen verwirklichen, so dass eine solche Anordnung prinzipiell auch Interferenzaufnahmen ermöglicht. Der besondere Wert dieser Kombi-

¹⁾ 7. Mitteilung, vgl. *Helv.* **35**, 82 (1952).

²⁾ *H. Svensson*, *Acta chem. Scand.* **4**, 399 (1950).