

149. Lignanglucoside aus *Podophyllum peltatum* L.

7. Mitteilung über mitosehemmende Naturstoffe¹⁾

von A. von Wartburg, E. Angliker und J. Renz.

Herrn Prof. Dr. T. Reichstein zum 60. Geburtstag gewidmet.

(29. V. 57.)

1. Einleitung.

Podophyllum peltatum L., eine in Nordamerika verbreitete *Berberidacee*, ist eine alte, schon den eingeborenen Indianerstämmen bekannte Arzneipflanze, die bei Wurmkrankheiten und als Purgativum und Emeticum Verwendung fand. Die nordamerikanische Pflanze, welche verschiedentlich als may apple, mandrake, wild lemon oder duck's foot bezeichnet wird, zeigt mit dem im Himalajagebiet heimischen *Podophyllum emodi* Wall. nicht nur morphologisch, sondern auch in bezug auf gewisse Inhaltsstoffe eine nahe Verwandtschaft²⁾. Die Droge besteht aus den getrockneten Rhizomen. Die Wirkstoffe wurden daraus durch Ausfällen eines alkoholischen Extraktes mit stark verdünnter wässriger Salzsäure erhalten. Dieses harzreiche Präparat ist unter der Bezeichnung *Resina podophylli* oder Podophyllin in den meisten europäischen Pharmakopöen aufgeführt³⁾.

In der modernen Medizin spielten die drastisch wirkenden *Podophyllum*-Drogen allerdings nur eine bescheidene Rolle. Erst als Kaplan⁴⁾ 1942 mit Podophyllin überraschende Heilerfolge bei der Behandlung von *Condylomata acuminata* erzielte, wurde bald erkannt, dass darin Wirkstoffe enthalten sind, welche die Zellteilung beeinflussen konnten. Seither wurden zahlreiche Untersuchungen über die antimitotischen Eigenschaften der *Podophyllum*-Stoffe publiziert⁵⁾. Parallel mit der klinischen und pharmakologischen Forschung setzte auch eine intensive chemische Neubearbeitung des Podophyllins ein. Als Wirkstoff war bisher lediglich das schon im Jahre 1880 von Podwyssotzki⁶⁾ kristallisiert erhaltene Podophyllotoxin (I) bekannt. Im amerikanischen Podophyllin (aus *P. peltatum*) ist es in einer Menge

¹⁾ 6. Mitteilung, Helv. **39**, 993 (1956).

²⁾ Eine dritte, ebenfalls im Himalajagebiet wachsende *Podophyllum*-Art wurde kürzlich als *P. sikkimensis* von Chatterjee & Mukerjee beschrieben. R. Chatterjee & S. K. Mukerjee, Indian Journ. Physiol. allied Sci. **4**, 7 (1950); R. Chatterjee, Records Bot. Survey of India **16**, No. 2, 48 (1953). Über die Inhaltsstoffe von *P. sikkimensis* vgl. R. Chatterjee & S. C. Chakravarti, Amer. pharm. Assoc. **41**, 415 (1952).

³⁾ H. Auterhoff & O. May, Pharmaz. Ztg. **102**, 282 (1957).

⁴⁾ J. W. Kaplan, New Orleans M. u. S. J. **94**, 388 (1942).

⁵⁾ M. G. Kelly & J. L. Hartwell, J. Nat. Cancer Inst. **14**, 967 (1954).

⁶⁾ V. Podwyssotzki, Arch. exp. Path. Pharmacol. **13**, 29 (1880).

von 10–20% enthalten; das indische Podophyllin (aus *P. emodi*) ist meist noch reicher an Podophyllotoxin. Die Fraktionierung des Podophyllins mit Hilfe chromatographischer Methoden führte in den letzten Jahren zur Isolierung einer Reihe von Begleitstoffen, die in ihrem chemischen Bau und in der biologischen Wirksamkeit dem Podophyllotoxin nahestehen. Die bisher aus den beiden Podophyllumarten isolierten Reinstoffe sind in Tab. 1 mit den Formeln und Eigenschaften zusammengestellt.

Tabelle 1.

Reinstoffe aus den Podophyllinen von *P. peltatum* und von *P. emodi*.

Chf = Chloroform; Py = Pyridin.

Pflanze	Lignan	Bruttoformel	Smp.	$[\alpha]_D^{20}$	Lit.
<i>P. peltatum</i>	Podophyllotoxin (I)	$C_{22}H_{22}O_8$	114–116°	– 132° (Chf)	6) ⁷⁾ 8)
	β -Peltatin (VI)	$C_{22}H_{22}O_8$	231–238°	– 119° (Chf)	9)
	α -Peltatin (IV)	$C_{21}H_{20}O_8$	231–233°	– 120° (Chf)	9)
	Desoxypodophyllotoxin (VII)	$C_{22}H_{22}O_7$	170–172°	– 123° (Chf)	10)
	Dehydropodophyllotoxin (VIII)	$C_{22}H_{18}O_8$	272–274°		11)
<i>P. emodi</i>	Podophyllotoxin (I)	$C_{22}H_{22}O_8$	114–116°	– 132° (Chf)	12) ⁸⁾
	4'-Demethylpodophyllotoxin (V)	$C_{21}H_{20}O_8$	250–252°	– 130° (Chf)	13)
	Picropodophyllin- β -D-glucosid (III)	$C_{28}H_{32}O_{13}$	237–238°	– 11,5° (Py)	13)

Verschiedentlich wurde auch eine mit Podophyllotoxin isomere, sehr schwer lösliche Verbindung, das Picropodophyllin (II) aus indischen oder amerikanischen Harzfraktionen beschrieben. Diese Verbindung liegt jedoch nicht ursprünglich in der Droge vor, sondern entsteht erst im Verlaufe der Aufarbeitung aus dem Podophyllotoxin.

Podophyllotoxin (I) und seine Begleitstoffe zählen nach ihrer chemischen Struktur zur Gruppe der Lignane¹⁴⁾, die eine grosse Zahl von Pflanzenstoffen umfasst, denen das 2,3-Dibenzylbutan als Kohlenstoffgerüst zugrunde liegt¹⁵⁾. Die Weiterführung der bereits von

7) R. Kuersten, Arch. Pharm. **229**, 220 (1891).

8) J. L. Hartwell & A. W. Schrecker, J. Amer. chem. Soc. **73**, 2909 (1951).

9) J. L. Hartwell & W. E. Detty, J. Amer. chem. Soc. **70**, 2833 (1948); **72**, 246 (1950).

10) H. Kofod & Chr. Jørgensen, Acta chem. scand. **9**, 346 (1955).

11) H. Kofod & Chr. Jørgensen, Acta chem. scand. **8**, 1296 (1954).

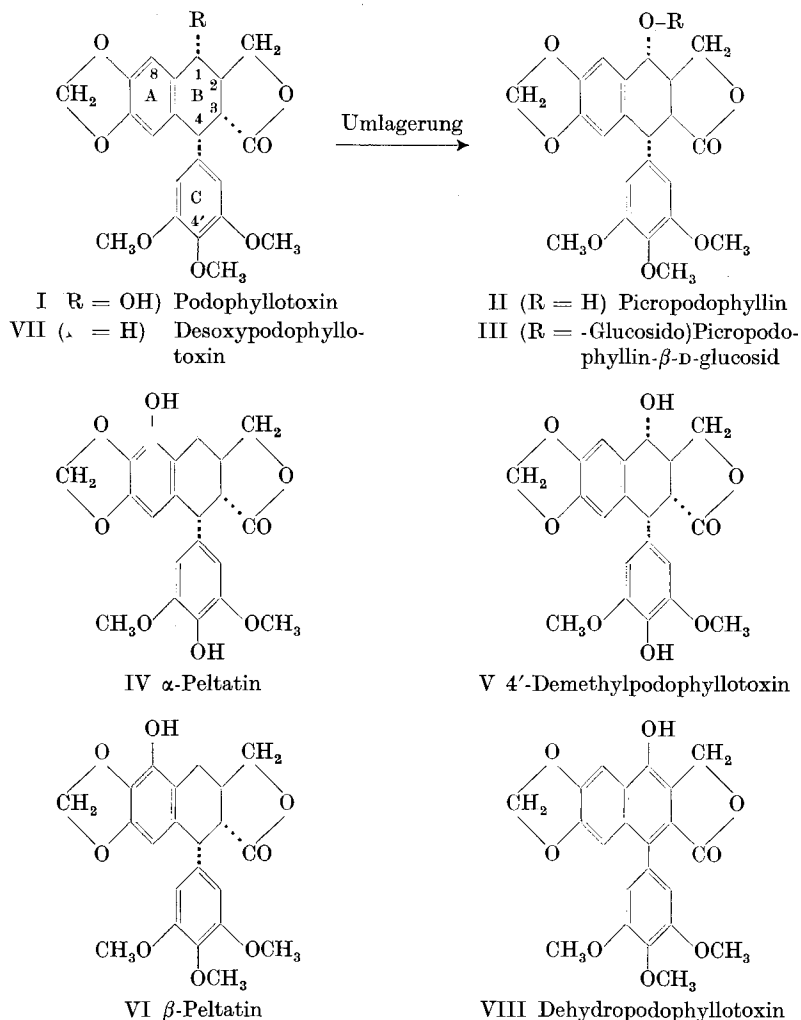
12) W. R. Dunstan & T. A. Henry, J. chem. Soc. **73**, 209 (1898).

13) M. V. Nadkarni, J. L. Hartwell, P. B. Maury & J. Leiter, J. Amer. chem. Soc. **75**, 1308 (1953).

14) Neuere Zusammenfassungen über Lignane: W. M. Hearon & W. S. MacGregor, Chem. Reviews **55**, 957 (1955); K. Hermann, Pharmazie **12**, 147 (1957).

15) R. D. Haworth, Ann. Reports Progress Chemistry **33**, 270 (1936).

*Spaeth*¹⁶⁾ und *Borsche*¹⁷⁾ begonnenen Konstitutionsermittlung durch *Hartwell* und seine Mitarbeiter¹⁸⁾ ergab für Podophyllotoxin die Formulierung I, in welcher auch die gegenseitige räumliche Beziehung der Substituenten festgelegt werden konnte. Die oben erwähnte Umlagerung des Podophyllotoxins (I) in Picropodophyllin (II), die schon



¹⁶⁾ *E. Spaeth, F. Wessely & J. Kornfeld*, Ber. deutsch. chem. Ges. **65**, 1536 (1932); *E. Spaeth, F. Wessely & E. Nadler*, *ibid.* **65**, 1773 (1932); **66**, 125 (1933).

¹⁷⁾ *W. Borsche & J. Niemann*, Liebigs Ann. Chem. **494**, 126 (1932); Ber. deutsch. chem. Ges. **65**, 1633, 1790 (1932).

¹⁸⁾ *J. L. Hartwell & A. W. Schrecker*, J. Amer. chem. Soc. **73**, 2909 (1951); **75**, 5916 (1953); **76**, 752 (1954); **77**, 432 (1955); *A. Schrecker & J. L. Hartwell*, J. org. Chemistry **21**, 381 (1956).

durch Spuren von Alkali ausgelöst wird, erfolgt durch eine Epimerisierung an C-3, wodurch der Lactonring aus der „natürlichen“ trans-Verknüpfung in die stabilere cis-Stellung (Picro-Form) übergeht. Der Ring B könnte in Bootform vorliegen: in diesem Fall würden in der Picro-Form nicht nur die zum Lactonring gehörenden Substituenten an C-2 und C-3, sondern auch die OH-Gruppe an C-1 und die Phenyl-Gruppe an C-4 die bevorzugte äquatoriale Lage einnehmen¹⁹⁾.

Ein weiterer Beweis für die *Hartwell'sche* Konzeption des Podophyllotoxins und seiner Derivate wurde von *Gensler et al.* durch die Totalsynthese des Picropodophyllins erbracht²⁰⁾.

Die in Tab. 1 erwähnten *Podophyllum*-Substanzen stammen aus der Harzfraktion und besitzen dementsprechend nur eine geringe Wasserlöslichkeit²¹⁾. Es erschien uns deshalb interessant, die Inhaltsstoffe der Rhizome und insbesondere auch die wässerigen Fraktionen, die bei der Herstellung des Podophyllins verloren gehen, auf das Vorliegen von löslichen Lignan-Verbindungen zu prüfen. Wie wir kürzlich mitteilen konnten, gelang es mit Hilfe der bei der Isolierung von Herzglykosiden entwickelten Extraktionsverfahren, aus dem indischen *P. emodi* zwei einheitliche glucosidische Verbindungen, das Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX)²²⁾ und das 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid (X)²³⁾ in relativ guten Ausbeuten zu gewinnen. Beide Glucoside werden durch β -glucosidase-haltige Fermentpräparate sehr leicht in D-Glucose und ihre entsprechenden Aglykone – Podophyllotoxin (I) und 4'-Demethylpodophyllotoxin (V) – gespalten. Ebenso prompt wie die Aglykone erleiden auch die Glucoside durch Alkali-Einwirkung eine Umlagerung in die entsprechenden epimeren Picro-Formen, Picropodophyllin- β -D-glucosid (III) bzw. 4'-Demethylpicropodophyllin- β -D-glucosid.

In Fortsetzung unserer Arbeiten berichten wir nun über die Isolierung von vier antimittotisch wirksamen glucosidischen Lignan-Verbindungen²⁴⁾²⁵⁾^{25a)} aus dem amerikanischen *P. peltatum*.

¹⁹⁾ A. W. Schrecker & J. L. Hartwell, J. Amer. chem. Soc. **76**, 752 (1954).

²⁰⁾ W. J. Gensler, C. M. Samour & S. Y. Wang, J. Amer. chem. Soc. **76**, 315 (1954); W. J. Gensler & S. Y. Wang, *ibid.* **76**, 5890 (1954).

²¹⁾ Picropodophyllin- β -D-glucosid ist trotz seiner Zuckerkomponente in Wasser sehr schwer löslich.

²²⁾ A. Stoll, J. Renz & A. von Wartburg, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3103 (1954); *Helv.* **37**, 1747 (1954).

²³⁾ A. Stoll, A. von Wartburg, E. Angliker & J. Renz, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5004 (1954).

²⁴⁾ Vorl. Mitt. A. Stoll, A. von Wartburg, E. Angliker & J. Renz, J. Amer. chem. Soc. **76**, 6413 (1954).

²⁵⁾ Vorl. Mitt. A. Stoll, A. von Wartburg & J. Renz, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1710 (1955).

^{25a)} Über die Pharmakologie dieser Verbindungen wird demnächst an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

2. Isolierung der Lignanglucoside.

Die vorsichtig, bei etwa 40° getrockneten Wurzelstöcke von *P. peltatum* wurden mit etwa 90-proz. Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde nach völliger Entfernung des Methanols mit Chloroform und Wasser aufgenommen. Nach Abtrennung des Chloroform-Vorextraktes versetzte man die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Methanol und fällte gerbstoffartige Verbindungen durch Zusatz von Bleiacetat aus. Die geklärte Lösung wurde im Vakuum vom Methanol befreit und das nunmehr rein wässrige Konzentrat erneut mit Chloroform, dann mit Chloroform-Butanol-Gemischen und schliesslich mit reinem Butanol erschöpfend ausgezogen. Die Inhaltsstoffe aus 3 kg Frischdroge verteilten sich wie folgt auf die einzelnen Extrakte:

Chloroform-Vorextrakt.	12,72 g
Chloroform-Extrakt	2,20 g
Chloroform-Butanol-(9:1)-Extrakt	12,14 g
Chloroform-Butanol-(7:3)-Extrakt	5,78 g
Butanol-Extrakt	15,30 g

Der Chloroform-Vorextrakt enthielt ca. 2 g eines ätherunlöslichen Gemisches von vorwiegend glykosidischen Stoffen. Die Hauptmenge des Extraktes bestand aus ätherlöslichen, öligen und harzigen Produkten, aus denen sich durch wiederholte chromatographische Fraktionierung lediglich eine geringe Menge (0,44 g) kristallisiertes Podophyllotoxin (I) abtrennen liess.

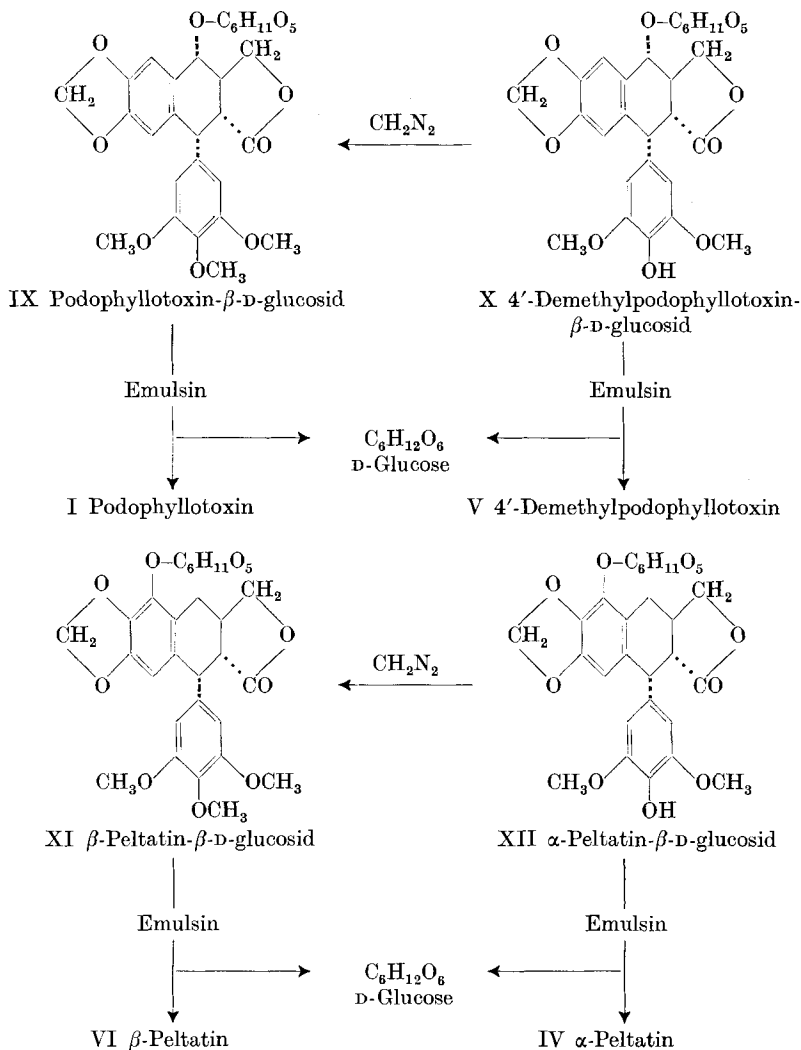
Der nach der Behandlung mit Bleiacetat gewonnene Chloroform-Extrakt konnte durch Verteilungschromatographie an Diatomiteinsäulen²⁶⁾ in einen Aglykonteil und eine Glykosidfraktion zerlegt werden. Der Aglykonteil lieferte nach Chromatographie an Aluminiumoxyd eine weitere Menge kristallisiertes Podophyllotoxin (I). Aus der Glykosidfraktion liess sich durch wiederholte Verteilungschromatographie das bereits im indischen *P. emodi* aufgefundene Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX)²²⁾ herausfraktionieren. Daneben wurde ein zweites, einheitliches Glykosid isoliert, das später als β -Peltatin- β -D-glucosid (XI) erkannt werden konnte.

Die Hauptmenge glykosidischer Stoffe war erwartungsgemäss im Chloroform-Butanol-(9:1)-Extrakt angereichert worden. Eine Probe des Extraktes wurde in einer *Craig*-Apparatur zwischen Wasser und Essigester verteilt. Aus dem Verlauf der Konzentrationskurve konnte auf das Vorliegen von zwei Hauptkomponenten mit sehr ähnlichen Verteilungszahlen geschlossen werden. Die Auftrennung des Extraktes gelang wiederum durch Verteilungschromatographie an Säulen von Diatomitstein. Die Hauptglykoside erwiesen sich als Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX) und β -Peltatin- β -D-glucosid (XI). In

²⁶⁾ Vgl. A. Stoll, J. Renz & A. von Wartburg, *Helv.* **37**, 1747 (1954). Die Methode wurde ursprünglich zur Isolierung von Herzglykosiden entwickelt. A. Stoll & W. Kreis, *Helv.* **34**, 1431 (1951).

den Nachlaufractionen der Säulen liessen sich noch zwei weitere, sehr leicht wasserlösliche Lignanderivate feststellen. Für die präparative Darstellung dieser Stoffe war jedoch der Chloroform-Butanol-(7:3)-Extrakt geeigneter.

Der Chloroform-Butanol-(7:3)-Extrakt bestand zu ca. 30% aus einer Hauptkomponente, die nach der Fraktionierung an Verteilungssäulen in kristallisierter Form isoliert werden konnte. Das Kristallisat erwies sich in der Folge als ein weiteres neues Lignanglykosid, nämlich als α -Peltatin- β -D-glucosid (XII). Als Begleitstoffe dieses Glucosids wurden noch reichliche Mengen Podophyllotoxin- β -D-glucosid und β -Peltatin- β -D-glucosid erhalten. Aus Zwischenfraktio-



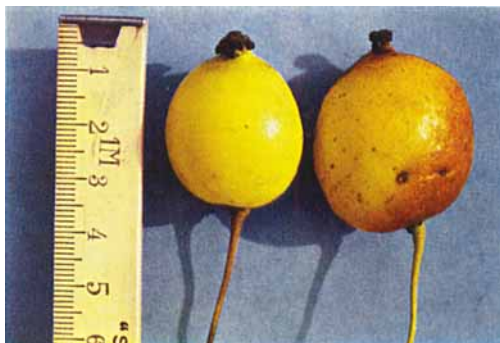


Podophyllum peltatum L.
Habitus der blühenden
Pflanze; die Blüten sind
meist unter den Blättern
versteckt



Podophyllum peltatum L.
Blüte

(Photos von Herrn
P. Achermann, Basel)



Podophyllum peltatum L.
Früchte (= May apple)

nen und aus den Mutterlaugen, die bei der Reinigung von α -Peltatin- β -D-glucosid anfielen, konnte in geringer Ausbeute ein viertes Lignanglykosid isoliert werden, das sich mit 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid (X) identifizieren liess.

Der Butanol-Extrakt enthielt praktisch keine Lignanglykoside, so dass auf eine genauere Untersuchung verzichtet wurde.

3. Eigenschaften und Konstitution der Glucoside aus *P. peltatum*.

Die wichtigsten Daten der aus dieser Droge isolierten Lignanglykoside sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Me = Methanol; Py = Pyridin.

Glucosid	Bruttoformel	Smp.	opt. Drehung		$V_z^{26a)}$	Ausbeute ^{26b)}
			Me	Py		
Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX)	$C_{28}H_{32}O_{13}$	152—154°	– 76°	– 117°	63	ca. 1 %
β -Peltatin- β -D-glucosid (XI)	$C_{28}H_{32}O_{13}$	156—159°	– 123°	– 169°	53	ca. 0,5 – 1 %
4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid (X)	$C_{27}H_{30}O_{13}$	165—170°	– 81°	– 123°	30	ca. 0,05 – 0,1 %
α -Peltatin- β -D-glucosid (XII)	$C_{27}H_{30}O_{13}$	168—170°	– 129°	– 174°	23	ca. 0,5 – 1,5 %

a) Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX). Dieses Glykosid wurde als weisses amorphes Pulver gewonnen, dessen Einheitlichkeit aus seinen Eigenschaften und aus dem symmetrischen Verlauf der Konzentrationskurve bei der multiplikativen Verteilung zwischen Essigester-Wasser hervorging. Das UV.-Spektrum (Fig. 5) und die IR.-Absorption (Fig. 1) stimmten bis in alle Details mit den entsprechenden Kurven des aus *P. emodi* isolierten Podophyllotoxin- β -D-glucosids²²⁾ (IX) überein. Zur weiteren Charakterisierung wurde die kristallisierte Acetylverbindung $C_{36}H_{40}O_7$ hergestellt, die bei 133 bis 134° schmolz und in Chloroform einen Drehwert von –90° aufwies. Mit verdünntem Ammoniak konnte das freie Glykosid quantitativ in das ebenfalls kristallisierte, epimere Picro-Derivat vom Doppelschmelzpunkt 231–232°/252–254° umgelagert werden. Die spezifische Drehung der Picro-Verbindung betrug $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ in Pyridin. Die beiden Derivate entsprachen in den Eigenschaften völlig den authentischen Vergleichspräparaten – Tetraacetyl-podophyllotoxin-

^{26a)} V_z = Verteilungszahl zwischen Essigester und Wasser; Bestimmung der V_z nach A. Stoll & W. Kreis, Helv. **18**, 124 (1935); A. Stoll, W. Kreis & A. von Wartburg, Helv. **37**, 1134 (1954).

^{26b)} Bezogen auf getrocknete Droge. Die frisch gegrabenen Wurzelstöcke enthielten etwa 90% Wasser.

β -D-glucosid²²⁾ bzw. Picropodophyllin- β -D-glucosid²²⁾ – und bewiesen die Identität dieses Glucosids aus *P. peltatum* (Smp. 152–154°; $[\alpha]_D = -70^\circ$ in Methanol) mit 1-O-(β -D-Glucopyranosido)-podophyllotoxin (IX). Über den enzymatischen Abbau des Podophyllotoxin- β -D-glucosids, der in glatter Reaktion zu D-Glucose und Podophyllotoxin führt, und die sich daraus ableitende β -glykosidische Verknüpfung der Zuckerkomponente berichteten wir bereits in einer früheren Mitteilung²²⁾.

b) β -Peltatin- β -D-glucosid (XI). Das zweite Lignanglykosid aus *P. peltatum* konnte ebenfalls nur in amorpher Form erhalten werden. Zur Reinheitsprüfung wurden wiederum die *Craig*-Verteilung des Glucosids zwischen Wasser und Essigester oder die Verteilungs-chromatographie an wassergesättigten Silicagelsäulen herangezogen. Das UV.-Spektrum (Fig. 5) war durch das für Podophyllum-Lignane typische Maximum bei 280 m μ ($\log \varepsilon = 3,41$) gekennzeichnet, und im IR.-Spektrum (Fig. 2) liess sich die Bande bei 1767 cm⁻¹ einem γ -Lactonring zuordnen. Als kristallisiertes Derivat des Glucosids konnte die bei 158–160° schmelzende Tetraacetylverbindung, C₃₆H₄₀O₁₇ hergestellt werden. Die Konstitutionsermittlung des neuen Glykosids wurde durch die in kurzer Zeit fast quantitativ ablaufende enzymatische Spaltung mit Emulsin sehr erleichtert. Es entstanden D-Glucose und ein kristallisiertes Aglucon C₂₂H₂₂O₈ mit dem Smp. 238–241° und $[\alpha]_D^{20} = -123^\circ$ (in Chloroform). Aus den physikalischen und chemischen Daten und aus dem Vergleich der UV.- und IR.-Spektren konnte das Spaltprodukt mit dem bereits bekannten β -Peltatin⁹⁾ (VI) identifiziert werden. Der Mischschmelzpunkt mit einem authentischen β -Peltatin-Präparat²⁷⁾ ergab keine Depression. Das aus dem Aglucon bereitete Acetylderivat, C₂₄H₂₄O₉ vom Smp. 233–234° und der optischen Drehung $[\alpha]_D^{20} = -129^\circ$ (in Chloroform) stimmte in allen Eigenschaften mit Acetyl- β -peltatin⁹⁾ überein.

Mit diesen Reaktionen war das neue *Peltatum*-Glucosid (Smp. 156–159°; $[\alpha]_D = -123^\circ$ in Methanol) als 8-O-(β -D-Glucopyranosido)- β -peltatin (XI) charakterisiert.

c) 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid (X). Dieses Glucosid konnte nur in geringer Menge aus der *Peltatum*-Droge gewonnen werden. In reiner Form stellt es ein weisses, amorphes Pulver dar, dessen Analysen das Vorliegen von lediglich zwei Methoxylgruppen anzeigte. Hingegen konnte eine freie, phenolische OH-Gruppe mit FeCl₃ nachgewiesen werden. Mit diesem Reagens entsteht in Wasser eine rostrote und in Alkohol eine grüne Färbung. Im UV.-Spektrum des Glucosids (Fig. 5) trat das bekannte Maximum bei 280 m μ ($\log \varepsilon = 3,51$) auf. Im Infrarot-Gebiet (Fig. 3) war eine starke Bande bei 1770 cm⁻¹ zu erkennen, die das Vorliegen eines γ -Lactons

²⁷⁾ Wir danken der Firma *S. B. Penick*, New-York, für die freundliche Überlassung von je 1 g α - und β -Peltatin.

vermuten liess. Der weitere Vergleich des IR.-Spektrums machte es sehr wahrscheinlich, dass diese Verbindung mit dem kürzlich aus dem indischen *Podophyllum emodi* isolierten 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid²³⁾ (X) identisch ist. Dafür sprachen auch die Eigen-

IR.-Absorptionsspektren*).

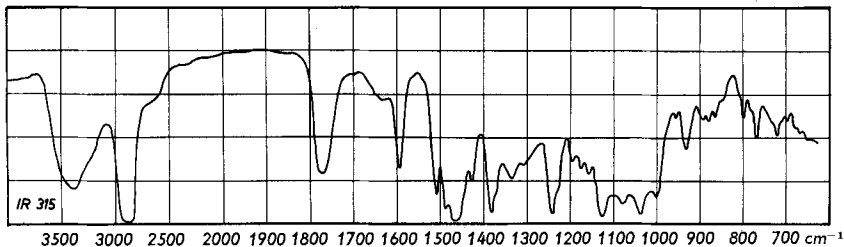


Fig. 1. Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX) (in Nujol).

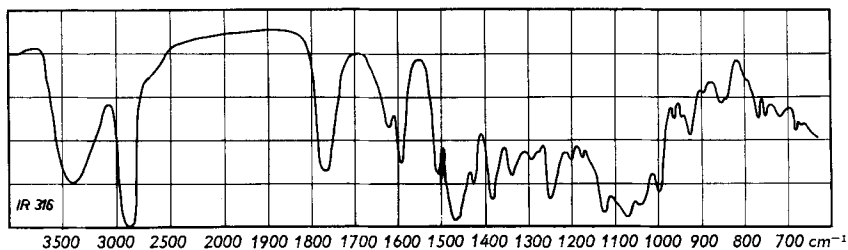


Fig. 2. β -Peltatin- β -D-glucosid (XI) (in Nujol).

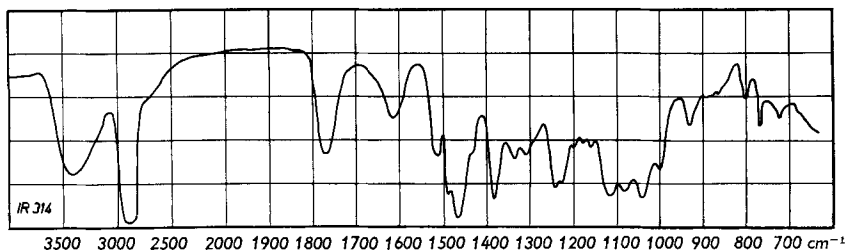


Fig. 3. 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid (X) (in Nujol).

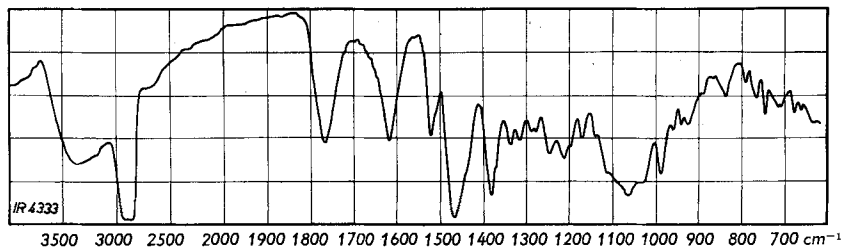


Fig. 4. α -Peltatin- β -D-glucosid (XII) (in Nujol).

*) Aufgenommen auf einem Perkin-Elmer-IR.-Spektro-Photometer Mod. 21.

schaften des kristallisierten Pentaacetylderivates $C_{37}H_{40}O_{18}$, dessen Smp. von $167-169^{\circ}$ und optische Drehung $[\alpha]_D^{20} = -76^{\circ}$ (in Chloroform) mit den entsprechenden Daten von Pentaacetyl-4'-demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid²³) in guter Übereinstimmung waren. Mit verdünnter Ammoniaklösung lagerte sich das freie Glucosid X in eine isomere, kristallisierte Picro-Verbindung um, die bei $274-278^{\circ}$ schmolz und einen Drehwert von -16° in Pyridin aufwies. Bei der Einwirkung von

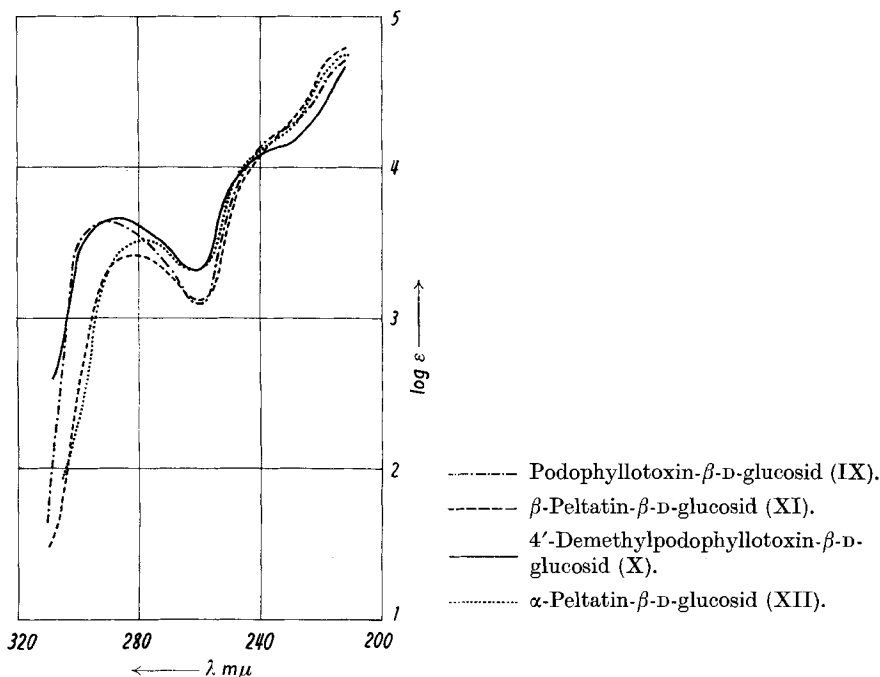


Fig. 5.

UV.-Spektren (in abs. Alkohol).

Emulsion entstand in guter Ausbeute D-Glucose und ein Aglucon $C_{21}H_{20}O_8$, das aus Alkohol in Plättchen vom Smp. $250-252^{\circ}$ ($[\alpha]_D^{20} = -131^{\circ}$) kristallisierte. Das Aglucon stimmt mit dem von *Hartwell* und Mitarb. beschriebenen 4'-Demethylpodophyllotoxin¹³) (V) in allen Eigenschaften überein. Zur weiteren Charakterisierung wurde es noch in das Diacetylderivat $C_{25}H_{24}O_{10}$ (Smp. $230-231^{\circ}$; $[\alpha]_D^{20} = -130^{\circ}$ in Chloroform) und das Picro-Derivat (Smp. $218-220^{\circ}$; $[\alpha]_D^{20} = +9^{\circ}$ in Aceton) übergeführt. Diese waren mit Diacetyl-4'-demethylpodophyllotoxin¹³) bzw. 4'-Demethylpicropodophyllin¹³) identisch.

Beim Behandeln von 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid (X) mit Diazomethan entstand als Hauptprodukt ein amorpher Stoff vom Smp. $152-154^{\circ}$; $[\alpha]_D^{20} = -76^{\circ}$ in Methanol, dessen Analysen zu der Bruttoformel $C_{28}H_{32}O_{13}$ mit 3 Methoxylgruppen führten. Das

Methylierungsprodukt stimmte in den UV.- und IR.-Spektren und in allen übrigen Daten völlig mit Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX) überein²²). Als Nebenprodukt entstand bei dieser Reaktion eine kleine Menge Picropodophyllin- β -D-glucosid. Durch die Überführung von 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid (X) in Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX) ist die Haftstelle der D-Glucose an C-1 bewiesen; das Glucosid (Smp. 165–170°; $[\alpha]_D^{20} = -81^\circ$ in Methanol) stellt demnach 1-O-(β -D-Glucopyranosido)-4'-demethylpodophyllotoxin (X) dar.

d) α -Peltatin- β -D-glucosid (XII). Die Hauptkomponente des Chloroform-Butanol-(7:3)-Extrakts konnte als einziges der bis jetzt isolierten genuinen *Podophyllum*-Glykoside in kristallisierter Form gefasst werden. Das Glykosid weist zwei Methoxylgruppen und eine freie phenolische OH-Gruppe auf. Die FeCl_3 -Reaktion fällt dementsprechend positiv aus und ergibt in Wasser eine rostrote und in Alkohol eine intensiv grüne Färbung. Aus dem UV.-Spektrum (Fig. 5), mit einem Maximum bei 280 m μ ($\log \epsilon = 3,51$) und aus dem IR.-Spektrum (Fig. 4), in dem die für den Lactonring charakteristische Bande bei 1775 cm^{-1} auftritt, konnte auf das Vorliegen eines weiteren podophyllotoxinähnlichen Lignans geschlossen werden. Mit Essigsäureanhydrid in Pyridin liess sich ein kristallisiertes Pentaacetylderivat $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_{18}$ gewinnen, das bei 222–223° schmolz; der Drehwert betrug $[\alpha]_D^{20} = -96^\circ$ (in Chloroform).

Die Spaltung des neuen Glykosids mit Emulsin führte zu D-Glucose und einem kristallisierten Aglucon, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_8$, mit einem Drehwert von -125° (Chloroform) und einem Smp. von 242–246°. Diese Daten für das Spaltstück, ebenso wie das Absorptions-Spektrum im UV. ($\lambda_{\text{max}} = 274 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 3,40$), stehen in guter Übereinstimmung mit den entsprechenden Eigenschaften des bekannten α -Peltatins⁹) (IV). Der Mischschmelzpunkt mit einem authentischen Vergleichspräparat²⁷) ergab keine Depression. Die Acetylierung, die zur weiteren Charakterisierung des Aglucons vorgenommen wurde, führte zu einem Diacetyl-Derivat $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ vom Smp. 233–234° und $[\alpha]_D^{20} = -113^\circ$ (in Chloroform), das mit Diacetyl- α -peltatin⁹) identisch war. Zur Lokalisierung der Haftstelle des Zuckers wurde α -Peltatin- β -D-glucosid (XII) mit Diazomethan methyliert. In praktisch quantitativer Ausbeute entstand bei dieser Reaktion ein amorphes Produkt, das in den Verteilungszahlen und in den Spektren mit dem oben beschriebenen β -Peltatin- β -D-glucosid (XI) völlig übereinstimmte. Der Smp. des Methylierungsproduktes lag bei 155–158°, und die optischen Drehwerte betrugen $[\alpha]_D^{20} = -122^\circ$ in Methanol bzw. $[\alpha]_D^{20} = -169^\circ$ in Pyridin. Die Elementaranalysen ergaben die Bruttoformel $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$ mit nunmehr 3 Methoxyl-Gruppen. Das Acetylderivat des methylierten Glucosids kristallisierte beim Animpfen mit Tetraacetyl- β -peltatin- β -D-glucosid und zeigte dieselben chemischen und physikalischen Daten. Durch die Methylierung des α -Peltatin- β -D-glucosids (XII)

zum β -Peltatin- β -D-glucosid (XI) konnte die Verknüpfungsstelle der D-Glucose an C-8 festgelegt werden; das neue *Peltatum*-Glykosid (Smp. 168–170°; $[\alpha]_D = -129^\circ$ in Methanol) stellt somit 8-O-(β -D-Glucopyranosido)- α -peltatin (XII) dar.

4. Nachweis und Bestimmung der Lignanglucoside.

Die Isolierung der *Podophyllum*-Glucoside, insbesondere die saubere Auftrennung der isomeren Glucoside des Podophyllotoxins und des β -Peltatins, wurde durch die amorphe Natur dieser Stoffe erschwert. Zur Gehaltsbestimmung angereicherter Fraktionen ermittelten wir anfänglich die bei der alkalischen Umlagerung entstandene Menge an kristallisiertem Picro-Derivat oder wir stellten die ebenfalls kristallisierten Acetylverbindungen her. In der Folge fanden wir auch in der Verteilungschromatographie der Glucoside an Silicagel²⁸⁾ ein zuverlässiges analytisches Hilfsmittel, das neben Reinheitsprüfungen auch eine Bestimmung der einzelnen Lignanverbindungen in rohen *Podophyllum*-Extrakten erlaubte.

Die Herstellung des Adsorbens und die Bereitung der Säulen beschrieben wir in einer früheren Mitteilung²⁸⁾. Als mobile Phase eignete sich wassergesättigter Essigester mit Zusätzen von 0,5–2% Methanol; in einigen Fällen, besonders zur Fraktionierung von Gemischen aus Podophyllotoxin- β -D-glucosid und β -Peltatin- β -D-glucosid, liess sich mit wassergesättigtem Isopropylacetat mit einem Gehalt von 0,5 bis 2% Methanol eine gute Trennung erreichen. Für die Fraktionierung der einzelnen Aglykone konnte mit gutem Erfolg Chloroform mit Zusätzen von Methanol bis zu 5% verwendet werden.

Tabelle 3.

Farbreaktionen der Lignanglucoside mit FeCl_3 .

Glucosid	Ausführung nach <i>Keller-Kiliani</i>	FeCl_3 in Alkohol
Podophyllotoxin- β -D-glucosid	weinrote Zone	negativ
β -Peltatin- β -D-glucosid	blau-violette Zone	negativ
4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid	weinrote Zone (H_2SO_4 -Phase) rotbraune Zone (Eisessig-Phase)	intensiv grün
α -Peltatin- β -D-glucosid	blau-violette Zone (H_2SO_4 -Phase) rotbraune Zone (Eisessig-Phase)	intensiv grün

Die Zuordnung der Komponenten in den Verteilungskurven ergab sich aus der Lage ihrer Konzentrationsmaxima, die mit den reinen Glu-

²⁸⁾ Die Chromatographie an Silicagel wurde zur Trennung herzwirksamer Glykoside und Aglykone entwickelt: A. Stoll, E. Angliker, F. Barfuss, W. Kussmaul & J. Renz, *Helv.* **34**, 1460 (1951).

cosiden festgelegt werden konnten. Ausserdem liessen sich die einzelnen Lignane auch durch Farbreaktionen differenzieren. Charakteristisch sind die Färbungen, die in Gegenwart von Eisenchlorid (auch in der Ausführung nach *Keller-Kiliani*) und in Essigsäureanhydrid mit konz. Schwefelsäure (*Liebermann-Reaktion*) entstehen. Die Unterschiede, die bei diesen Reaktionen auftreten, gehen aus den Tab. 3 und 4 hervor.

Tabelle 4.
Liebermann-Reaktion der Lignanglucoside.

Glucosid	10'	20'	60'
Podophyllotoxin- β -D-glucosid	schwach rotbraun	braunrot	braunrot
β -Peltatin- β -D-glucosid	sofort blau, dann violett	violett	violett
4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid	schwach grün	gelbgrün	gelbgrün
α -Peltatin- β -D-glucosid	schwach graugrün	schwach violett	violett

Als Beispiel für eine Verteilungschromatographie ist in Fig. 6 das Verhalten von Podophyllotoxin- β -D-glucosid und 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid an wassergesättigtem Silicagel angeführt.

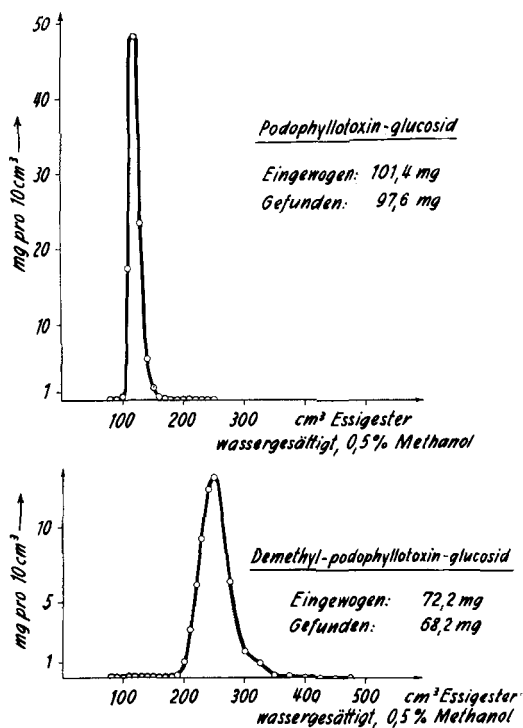


Fig. 6.

Prüfung von Podophyllotoxin- β -D-glucosid und 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid an wassergesättigtem Silicagel.

Die Brauchbarkeit der chromatographischen Bestimmung geht auch aus dem in Fig. 7 dargestellten Versuch hervor, bei welchem die Trennung eines künstlichen Gemisches der beiden bekannten *Podophyllum-emodi*-Glucoside und des Aglykons Podophyllotoxin erzielt wurde. Wie ersichtlich, ist die Trennung ausgezeichnet. Die Glucoside werden quantitativ aus der Silicagelsäule eluiert; das verwendete 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid war in diesem Fall noch nicht ganz rein.

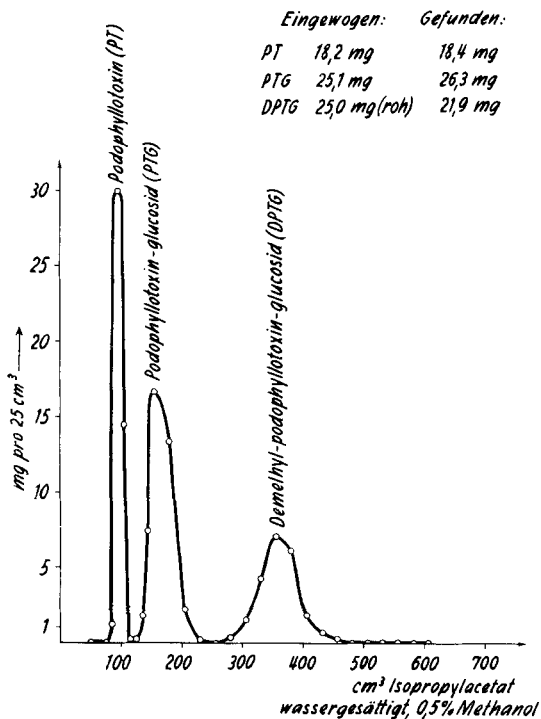


Fig. 7.

Trennung eines Gemisches von Podophyllotoxin, Podophyllotoxin- β -D-glucosid und 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid an wassergesättigtem Silicagel.

Ein künstliches Gemisch der 4 *Podophyllum-peltatum*-Glucoside und des Aglykons Podophyllotoxin ergab das in Fig. 8 dargestellte Bild. Als mobile Phase diente hier wie bei Fig. 7 Isopropylacetat. Die entsprechenden Maxima liegen aber gleichwohl nicht an der gleichen Stelle, da verschiedene Silicagelchargen verwendet worden sind.

Die Untersuchung von rohen Glucosidpräparaten ist besonders als Hilfsmittel zur präparativen Gewinnung der Glucoside wichtig. Ein Gemisch, wie es z. B. in den vorher erwähnten Chloroform:n-Butanol-(7:3)-Extrakten vorliegt, ergibt bei der Chromatographie an Silicagel, wie aus Fig. 9 hervorgeht, für die Beurteilung dieser Ex-

trakte brauchbare Hinweise. Hier könnten sich allerdings in den einzelnen Fraktionen noch unbekannte Stoffe mit ähnlichen Verteilungskoeffizienten verbergen. Die präparativen Versuche bestätigen, dass die einzelnen Maxima mit den hier beschriebenen 4 Glykosiden korrespondieren.

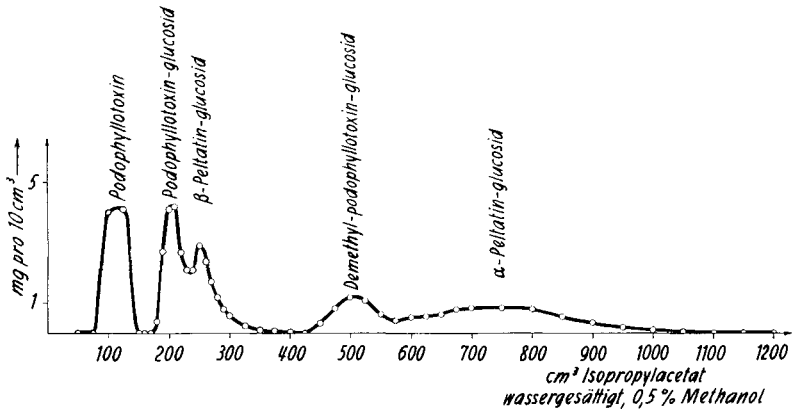


Fig. 8.

Trennung eines Gemisches von Podophyllotoxin und der 4 bekannten *Podophyllum-peltatum*-Glucoside an wassergesättigtem Silicagel.

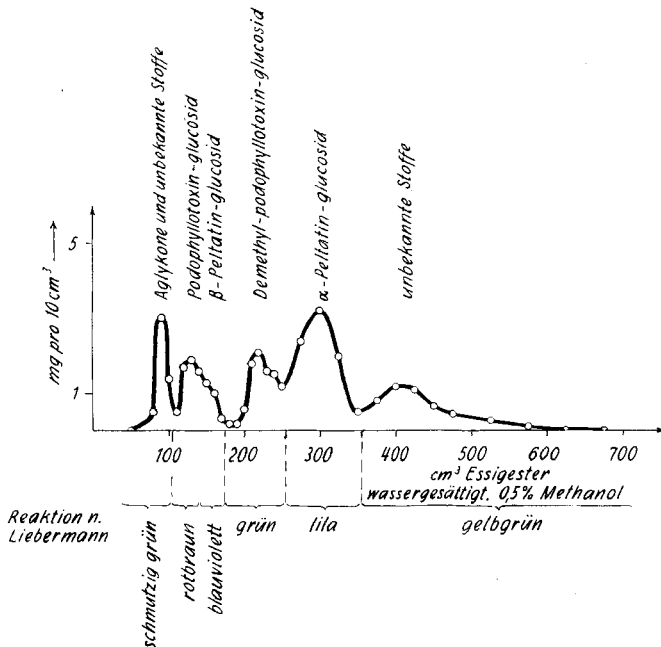


Fig. 9.

Aufteilung eines rohen Chloroform:n-Butanol-(7:3)-Extraktes aus *Podophyllum peltatum* an wassergesättigtem Silicagel.

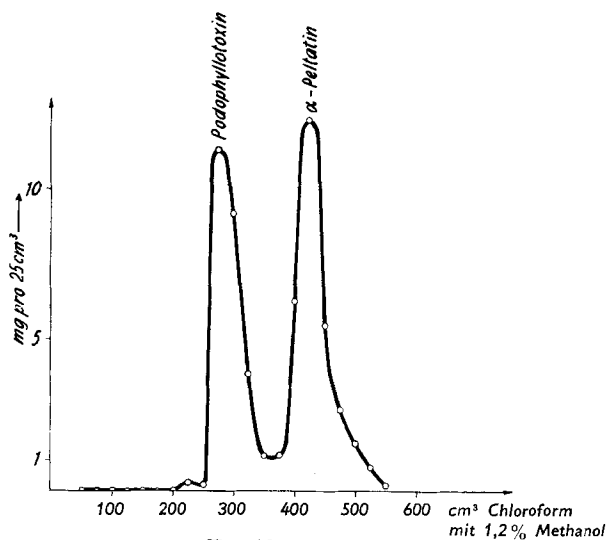


Fig. 10.

Trennung von Podophyllotoxin und α -Peltatin an trockenem Silicagel.

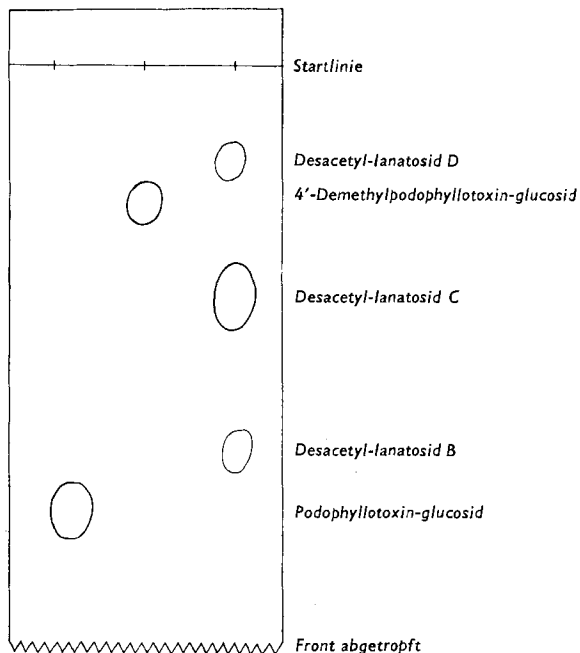


Fig. 11.

Papierchromatogramm (Durchlauf) von Podophyllotoxin-glucosid, 4'-Demethylpodophyllotoxin-glucosid und Desacetyl-ianoside B, C und D nach *Kaiser*³⁰. Lösungsmittelsystem: Chloroform: Tetrahydro-furan: Formamid 50:50:6,5. Papier: *Whatman* Nr. 3 mit 20% Formamid in Aceton vorbehandelt.

Zur Trennung und Identifizierung der verschiedenen *Podophyllum*-Aglucone haben Jørgensen & Kofod²⁹⁾ papierchromatographische Methoden angegeben. Mit der Wiedergabe der Fig. 10 sei angedeutet, dass sich zur Identifizierung und ganz besonders auch für die präparative Herstellung der einzelnen Aglucone trockenes Silicagel und Chloroform-Methanol-Gemische als Eluierungsmittel recht gut eignen.

Die Papierchromatographie eignet sich auch zur Trennung der *Podophyllum*-Glucoside. Fig. 11 zeigt ein nach der für herzwirksame Glykoside ausgearbeiteten Methode von Kaiser³⁰⁾ entwickeltes Papierchromatogramm von Podophyllotoxin-glucosid und 4'-Demethylpodophyllotoxin-glucosid. Die Sichtbarmachung der Flecken erfolgte mit Antimonpentachlorid nach Jørgensen & Kofod²⁹⁾. Zum Vergleich der Rf-Werte dieses Durchlaufchromatogramms haben wir die bekannten Desacetyl-anatoside B, C und D³¹⁾ mitlaufen lassen.

Experimenteller Teil³²⁾.

1. Extraktion der Rhizome und Wurzeln.

3 kg frische Rhizome und Wurzeln von *P. peltatum* wurden bei 40° getrocknet und dann fein gemahlen. Das Drogenpulver rührte man mehrmals mit je 6 l 90-proz. Methanol je 1½ Std. aus. Die vereinigten wässrig-methanolischen Extrakte engte man im Vakuum bei höchstens 50° (Badtemp.) bis zur völligen Entfernung des Methylalkohols ein und verdünnte das Konzentrat (durch Zusatz von Wasser) auf 4 l. Durch zweimaliges Ausschütteln mit je 700 cm³ Chloroform liessen sich 12,8 g vorwiegend harzige Verunreinigungen ausschütteln (Chloroform-Vorextrakt). Die wässrige Phase wurde mit 4,5 l Methanol versetzt und zur Fällung von gelben Farb- und Gerbstoffen unter Rühren 130 cm³ 30-proz. Bleiacetat-lösung zugegeben. Den pH-Wert der Reaktionslösung stellte man auf 6,0 ein und filtrierte den flockigen, gelben Niederschlag ab. Das klare, hellgelb gefärbte Filtrat wurde durch Konzentration im Vakuum vom Methanol befreit, und das verbleibende wässrige Konzentrat (4 l) der Reihe nach zweimal mit je 800 cm³ Chloroform, fünfmal mit je 800 cm³ Chloroform-Butanol (9:1), fünfmal mit je 800 cm³ Chloroform-Butanol (7:3) und zuletzt dreimal mit je 2 l reinem Butanol ausgeschüttelt. An einzelnen Extrakten wurden dabei erhalten:

Chloroform-Extrakt	2,20 g
Chloroform-Butanol-(9:1)-Extrakt	12,14 g
Chloroform-Butanol-(7:3)-Extrakt	5,78 g
Butanol-Extrakt	15,30 g

Die verbleibende wässrige Phase wurde verworfen.

2. Isolierung der Glykoside.

a) Der Chloroform-Vorextrakt. 12,8 g Chloroform-Vorextrakt löste man in 25 cm³ abs. Methanol und liess die braun gefärbte Lösung unter Rühren in 250 cm³ trockenen Äther eintropfen. Die dabei in hellen Flocken sich abscheidende Fällung wurde abfiltriert und mit Äther gewaschen (2,03 g). Durch Verteilung dieser Substanz zwischen

²⁹⁾ Chr. Jørgensen & H. Kofod, Acta chem. scand. **8**, 941 (1954).

³⁰⁾ F. Kaiser, Ber. deutsch. chem. Ges. **88**, 556 (1955).

³¹⁾ Über Lanatosid D ist eine Arbeit in *Liebig's Ann. Chem.* in Druck.

³²⁾ Alle Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt. Zur Bestimmung der opt. Drehung wurden die Präparate 1 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet. Die Analysen wurden in unserem Mikroanalytischen Laboratorium (Dr. W. Schöniger) ausgeführt. Die Spektren wurden in unserer Spektralanalytischen Abteilung (Dr. H. G. Leemann) aufgenommen; die Interpretation der IR.-Spektren verdanken wir Herrn Dr. M. Kohler.

Wasser und Essigester in einer *Craig*-Apparatur oder an Silicagelsäulen liessen sich ca. 400 mg rohes Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX) und ca. 700 mg rohes β -Peltatin- β -D-glucosid (XI) gewinnen.

Das Filtrat aus der Methanol-Äther-Fällung wurde eingedampft (10,7 g) und an alkalifreiem Aluminiumoxyd chromatographiert. Durch Elution mit Chloroform konnten 500 mg kristallisiertes Podophyllotoxin (I) vom Smp. 111—117° abgetrennt werden. Durch Nachchromatographie der amorphen Fraktionen liessen sich noch weitere 70 mg rohes, kristallisiertes Podophyllotoxin isolieren. Das verbleibende amorphe Material wurde nicht weiter untersucht³³⁾.

b) Der Chloroform-Extrakt. 2,02 g des Chloroform-Extraktes wurden mit 10 g Diatomitstein²⁵⁾ gemischt und auf eine 4 m hohe Säule aus 1400 g trockenem Diatomitstein verbracht. Durch Elution mit wassergesättigtem Essigester liessen sich in den ersten Fraktionen 980 mg Aglykone gewinnen, die später eluierten Fraktionen bestanden aus rohem Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX) und β -Peltatin- β -D-glucosid (XI) sowie aus Mischfraktionen dieser beiden Glucoside.

Tabelle 5.
Fraktionierung des Chloroform-Butanol-(9:1)-Extraktes.

Frakt. Nr.	Lösungsmittel je 1 l	Subst. mg	Rückstand
1	Essigester wassergesättigt	20	} <i>Liebermann</i> : rotbraun = Podophyllotoxin- β -D-glucosid
2	Essigester wassergesättigt	5	
3	Essigester wassergesättigt	120	
4	Essigester wassergesättigt	220	
5	Essigester wassergesättigt	340	
6	Essigester wassergesättigt	420	} <i>Liebermann</i> : rotbraun-violett; Gemisch aus Podophyllotoxin- β -D-glucosid und β -Peltatin- β -D-glucosid
7	Essigester wassergesättigt	590	
8	Essigester wassergesättigt	800	
9	Essigester wassergesättigt	910	
10	Essigester wassergesättigt	830	
11	Essigester wassergesättigt	800	} <i>Liebermann</i> : intensiv blau \rightarrow violett = β -Peltatin- β -D-glucosid
12	Essigester wassergesättigt	680	
13	Essigester wassergesättigt	550	
14	Essigester wassergesättigt	440	
15	Essigester wassergesättigt	330	
16	Essigester wassergesättigt	240	} <i>Liebermann</i> : blau \rightarrow violett; hauptsächlich β -Peltatin- β -D-glucosid, daneben wenig α -Peltatin- β -D-glucosid und 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid
17	Essigester wassergesättigt	230	
18	Essigester wassergesättigt	200	
19	Essigester wassergesättigt	160	
20	Essigester wassergesättigt	150	
21	Essigester wassergesättigt	100	
22	Essigester wassergesättigt	90	
23	Essigester wassergesättigt	50	
24	Essigester wassergesättigt	40	
25	Essigester wassergesättigt	40	
26	Essigester wassergesättigt	30	
27	Methanol 2,5 Liter	50	

³³⁾ Durch Nachfraktionierung des amorphen Anteils könnten eventuell α - und β -Peltatin gewonnen werden.

Aus dem Aglykonanteil konnten durch Chromatographie an Aluminiumoxyd 300 mg kristallisiertes Podophyllotoxin vom Smp. 110–118° erhalten werden.

c) Der Chloroform-Butanol-(9:1)-Extrakt. Nachdem Vorversuche zur Abtrennung dieses Extraktes an Diatomitsteinsäulen und durch Verteilung nach dem Gegenstromprinzip (Wasser-Essigester) das Vorliegen von zwei Hauptglykosiden angezeigt hatten, wurde zur präparativen Darstellung dieser Verbindungen wie folgt vorgegangen:

Mit dem Gemisch von 10 g Extrakt und 150 g trockenem Diatomitstein wurde eine 4 m hohe Säule aus Diatomitstein (4050 g) beschickt und mit nassem Essigester eluiert. Das dabei erhaltene Chromatogramm ist in Tab. 5 wiedergegeben.

Die Fraktionen 3–5 bestanden aus fast reinem Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX).

Die Mischfraktionen 6–10 wurden erneut einer Fraktionierung an der trockenen Diatomitsteinsäule unterworfen, wobei noch eine weitere Menge der reinen Glucoside erhalten werden konnte.

Das aus den Fraktionen 11–18 gewonnene Material wurde mit den durch Nachchromatographie der Fraktionen 6–10 gewonnenen rohen β -Peltatin- β -D-glucosid vereinigt und stellte ein Glucosidpräparat von ca. 80-proz. Reinheit dar.

Aus den Fraktionen 19–26 konnte durch erneute Verteilungschromatographie an Diatomitstein ein weiteres, vorwiegend aus β -Peltatin- β -D-glucosid bestehendes Präparat gewonnen werden. In den letzten Fraktionen des Nachchromatogramms war das α -Peltatin- β -D-glucosid (XII) angereichert worden und kristallisierte bei Acetonzugabe in feinen Nadeln (die weitere Reinigung des α -Peltatin-glucosids ist weiter unten beschrieben).

d) Der Chloroform-Butanol-(7:3)-Extrakt. Zur Fraktionierung dieses Extraktes vermischte man 2,5 g Substanz mit 60 g Diatomitstein und 20 cm³ Wasser und beschickte mit diesem Gemisch eine 4 m hohe Säule von angefeuchtem Diatomitstein (1400 g Träger und 425 cm³ Wasser). Durch Elution mit wassergesättigtem Essigester wurde das in der Tab. 6 aufgeführte Chromatogramm erhalten.

Tabelle 6.

Frakt. Nr.	Lösungsmittel je 250 cm ³	Subst. mg	Bemerkungen
1	Essigester wassergesättigt	30	<i>Liebermann</i> : braunrot, später violettstichig; Podophyllotoxin- β -D-glucosid
2	Essigester wassergesättigt	230	
3	Essigester wassergesättigt	330	
4	Essigester wassergesättigt	200	<i>Liebermann</i> : blau \rightarrow violett; vorwiegend β -Peltatin- β -D-glucosid
5	Essigester wassergesättigt	110	
6	Essigester wassergesättigt	50	
7	Essigester wassergesättigt	50	<i>Liebermann</i> : blass violett; Mischfraktionen
8	Essigester wassergesättigt	90	
9	Essigester wassergesättigt	90	
10	Essigester wassergesättigt	120	<i>Liebermann</i> : negativ nach 5–10' (schwach gelblich-grün); wässrige Fe-Cl ₃ : rostrot; Alkohol-FeCl ₃ : grün. α -Peltatin- β -D-glucosid und wenig 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid
11	Essigester wassergesättigt	160	
12	Essigester wassergesättigt	110	
13	Essigester wassergesättigt	60	
14	Essigester wassergesättigt	20	
15	Essigester wassergesättigt	10	
16	Essigester wassergesättigt	5	
17	Essigester wassergesättigt	—	
18	Methanol 2 l	330	keine positiven Farbreaktionen

Die Fraktionen 1—5 setzten sich auf Grund der Farbreaktionen aus einem Gemisch von Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX) und β -Peltatin- β -D-glucosid (XI) zusammen. Die beiden Glucoside wurden durch Verteilungsanalysen an Silicagelsäulen mit wassergesättigtem Isopropylacetat unter Zusatz von 0,5% Methanol weiter aufgetrennt und durch Smp., Drehwert, Lage des Maximums der Konzentrationskurve und Farbreaktionen charakterisiert. Die Fraktionen 8—15 stellten rohes α -Peltatin-glucosid (XI) dar, das noch eine geringe Menge 4'-Demethylpodophyllotoxin-glucosid (X) enthielt.

Das restliche Material des Chloroform-Butanol-(7:3)-Extraktes wurde in gleicher Weise aufgetrennt. Zur Gewinnung des α -Peltatin- β -D-glucosids verteilte man die gesammelten Rohpräparate (1,6 g) erneut an Diatomitsteinsäulen, wobei es gelang, die Spitzenfraktionen mit Aceton zur Kristallisation zu bringen. Aus den Nebenfraktionen und anfallenden Mutterlaugen wurden nach mehrmaliger Chromatographie an wassergesättigten Silicagelsäulen rund 200 mg weitgehend einheitliches 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid (X) isoliert.

c) Der Butanol-Extrakt. Mit Hilfe von Silicagelsäulen und durch Farbreaktionen konnte festgestellt werden, dass der Butanol-Extrakt nur sehr geringe Mengen Lignanverbindungen enthielt, so dass auf weitere Bearbeitung dieses Extraktes verzichtet wurde.

3. Charakterisierung der neuen Glykoside.

a) Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX). Sämtliche Podophyllotoxin-glucosidhaltige Fraktionen aus den Verteilungssäulen wurden vereinigt und erneut an Diatomitstein zwischen Wasser und Essigester verteilt. Das dabei gewonnene Spitzenpräparat (2,4 g) löste man in 20 cm³ trockenem Aceton und liess die klare Lösung zu 200 cm³ abs. Äther tropfen. Die abgeschiedenen weissen amorphen Flocken wurden abfiltriert, mit Äther gewaschen und lieferten ein einheitliches Präparat von Podophyllotoxin- β -D-glucosid (IX). Die Ausbeute betrug 1,9 g Glucosid vom Smp. 152—154°³⁴); $[\alpha]_D^{20} = -76,4^0$ ($c = 0,576$ in Methanol) und $[\alpha]_D^{20} = -117,0^0$ ($c = 0,668$ in Pyridin).

Der Schmelzpunkt mit authentischem Podophyllotoxin- β -D-glucosid aus *P. emodi*²²) zeigte keine Depression. Die Analysenprobe wurde 15 Std. bei 95° im Hochvakuum getrocknet und im Schweinchen eingewogen.

C ₂₈ H ₃₂ O ₁₃	Ber. C 58,33	H 5,60	(3)CH ₃ O 16,15%
(576,54)	Gef. „ 58,36; 58,53; 58,24	„ 5,77; 5,80; 5,52	„ 16,07%

Podophyllotoxin-glucosid ist hygroskopisch und wird nur bei Anwendung peinlich trockener Lösungsmittel bei der Aceton-Äther-Fällung in wasserfreiem Zustand gewonnen. UV- und IR.-Spektren siehe theoret. Teil.

Da das Glucosid nur in amorpher Form vorliegt, wurden zur weiteren Identifizierung die beiden folgenden kristallisierten Derivate dargestellt.

Tetraacetyl-Verbindung des Podophyllotoxin- β -D-glucosids. Die aus 200 mg Glucosid in üblicher Weise dargestellte Acetylverbindung wurde in praktisch quantitativer Ausbeute in Form weisser Prismen erhalten. Smp. 133—134°; Misch-Smp. mit authentischem Tetraacetylpodophyllotoxin- β -D-glucosid³⁵) ohne Depression. $[\alpha]_D^{20} = -89,7^0$ ($c = 0,636$ in Chloroform).

Picropodophyllin- β -D-glucosid (III). 300 mg Podophyllotoxin-glucosid wurden in 15 cm³ Methanol mit 1,5 cm³ konz. NH₃-Lösung 20 Min. unter Rückfluss gekocht. Die abgeschiedenen Kristalle schmolzen nach Umlösen aus 75-proz. Methanol bei 231 bis 233°/252—254°; Misch-Smp. mit Picropodophyllin- β -D-glucosid³⁶) ohne Depression. $[\alpha]_D^{20} = -10,9^0$ ($c = 0,549$ in Pyridin).

³⁴) Für Podophyllotoxin- β -D-glucosid aus *P. emodi* haben wir angegeben²²): Smp. 152—154°; $[\alpha]_D^{20} = -75,2^0$ (in Methanol).

³⁵) Wir haben früher²²) für die Tetraacetyl-Verbindung des Podophyllotoxin- β -D-glucosids den Smp. 134—135° und $[\alpha]_D^{20} = -90,8^0$ (in Chloroform) gefunden.

³⁶) Wir haben früher²²) für Picropodophyllin- β -D-glucosid angegeben: Smp. 235—236°/252—254° und $[\alpha]_D^{20} = -10,5^0$ (in Pyridin).

b) β -Peltatin- β -D-glucosid (XI). Das bei der Verteilungschromatographie anfallende Präparat und die aus der Nachchromatographie gewonnene Substanz wurden vereinigt (3,5 g) und zur weiteren Anreicherung nochmals an Diatomitstein chromatographiert. 3,5 g des Sammelpräparates wurden auf eine 4 m hohe Säule aus 1400 g trockenem Diatomitstein gebracht. Zur Elution diente wassergesättigter Essigester, von welchem 60 Fraktionen von je 100 cm³ aufgefangen wurden. Die Abtrennung des beigemischten Podophyllotoxin-glucosids konnte mit der *Liebermann'schen* Farbreaktion verfolgt werden. Nach den ersten 25 Fraktionen war das Glucosid vollständig ausgeschieden, so dass das Material aus den Fraktionen 25–44 vereinigt werden konnte (1,15 g) und weitgehend einheitliches β -Peltatin-glucosid darstellte. Die gleiche Reinigungsoperation wurde mit 3,84 g von verschiedenen Zwischenfraktionen, in denen β -Peltatin-glucosid angereichert war, wiederholt und lieferte 910 mg eines Glucosidpräparates von ähnlicher Reinheit.

1,15 g des aus dem hier beschriebenen Versuch erhaltenen Präparates löste man in 5 cm³ trockenem Aceton und fällte das Glucosid mit 100 cm³ abs. Äther aus. Die Ausbeute betrug 1,01 g eines weissen amorphen Pulvers mit einem Zersetzungspunkt bei 156–159°.

Obschon das Präparat bei der *Craig*-Verteilung eine symmetrische Konzentrationskurve (bei 30 Transfers) ergibt, liessen sich durch Verteilungsanalyse an Silicagel mit wassergesättigtem Isopropylacetat + 0,5% Methanol noch ca. 10% Podophyllotoxin-glucosid abtrennen. Ein derartig weiter gereinigtes Präparat zeigte den Zersetzungspunkt 154 bis 156°; $[\alpha]_D^{20} = -122,7^\circ$ (c = 0,587 in Methanol) und $[\alpha]_D^{20} = -169,2^\circ$ (c = 0,556 in Pyridin). Auch bei erneuter Chromatographie liess sich kein Podophyllotoxin-glucosid mehr nachweisen. Alle Versuche zur Kristallisation scheiterten; ein Präparat mit den obigen Eigenschaften darf als weitgehend einheitlich betrachtet werden.

Zur Analyse wurde die Substanz 15 Std. bei 95° im Hochvakuum getrocknet und im Schweinchen eingewogen.

C ₂₈ H ₃₂ O ₁₃	Ber. C 58,33	H 5,60	(3)CH ₃ O 16,15%
(576,54)	Gef. „ 58,42	„ 5,79	„ 16,30%

Zur eindeutigen Charakterisierung dieses amorphen Glucosides konnte das kristallisierte Tetraacetyl-Derivat dargestellt und ein enzymatischer Abbau durchgeführt werden.

Tetraacetyl-Verbindung des β -Peltatin- β -D-glucosids. 350 mg β -Peltatin- β -D-glucosid wurden in der Mischung von 4 cm³ abs. Pyridin und 4 cm³ Essigsäureanhydrid unter Feuchtigkeitsschluss ca. 15 Std. stehengelassen. Die Reaktionslösung wurde in 100 cm³ Wasser gegossen und die abgeschiedenen weissen Flocken nach ca. 5 Std. abfiltriert. Das rohe Acetat wurde in Chloroform aufgenommen und die Chloroformlösung mehrmals mit wenig Wasser ausgewaschen. Die Chloroformphase trocknete man über Na₂SO₄ und dampfte im Vakuum ein. Der Rückstand, 440 mg weisser Schaum, wurde in Benzol aufgenommen und an alkalifreiem Aluminiumoxyd chromatographiert. Die mit Benzol und Benzol-Chloroform (1:1) eluierten Fraktionen kristallisierten beim Anreiben mit Methanol in weissen Prismen (430 mg Rohkristallisat). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus der 5fachen Menge Methanol schmolz die Tetraacetyl-Verbindung des β -Peltatin- β -D-glucosids bei 158–160°; $[\alpha]_D^{20} = -93,2^\circ$ (c = 0,637 in Chloroform). UV.-Spektrum: λ_{\max} 281 m μ (log ϵ = 3,44).

C ₃₆ H ₄₀ O ₁₇	Ber. C 58,06	H 5,41	O 36,53	(3)CH ₃ O 12,50	(4)CH ₃ CO 23,12%
(744,68)	Gef. „ 57,94	„ 5,56	„ 36,35	„ 12,29	„ 19,79%

Enzymatischer Abbau von β -Peltatin- β -D-glucosid: Die Lösung von 900 mg β -Peltatin- β -D-glucosid in 12,5 cm³ abs. Alkohol wurde mit der Lösung von 500 mg Emulsin in 250 cm³ 1/50-m. Acetatpuffer (pH 5) vermischt und unter Rühren während 24 Std. bei 37° gehalten. Die anfänglich klare Lösung trübte sich allmählich, und es schied sich eine milchige Fällung aus, die mit der Zeit in einen körnigen, kristallisierten Niederschlag überging. Man filtrierte, wusch die körnige Masse mit 50 cm³ Wasser nach und brachte den Rückstand durch Schütteln mit 50 cm³ Chloroform in Lösung. Die trübe Chloroformlösung wurde filtriert, eingedampft und lieferte 620 mg weissen Schaum, der, mit wenig Benzol angerieben, sofort durchkristallisierte.

Die von der körnigen Ausscheidung abgetrennte wässrige Fermentlösung wurde fünfmal mit je 50 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. Aus den vereinigten Chloroformextrakten wurden noch ca. 30 mg Aglykon in Form eines schaumigen Rückstandes gewonnen. Die wässrigen Phasen, die den abgespaltenen Zuckerrest enthielten, wurden eingedampft und, wie weiter unten beschrieben, aufgearbeitet.

Identifizierung des Aglykons als β -Peltatin (VI): 620 mg der rohen Aglykonfraktion wurden zuerst aus Benzol, dann aus abs. Alkohol umkristallisiert und lieferten farblose Prismen vom Smp. 238—241° (leichtes Sintern ab 234°); Misch-Smp. mit einem authentischen, ebenfalls aus abs. Alkohol umkristallisierten β -Peltatinpräparat³⁷⁾ (Smp. 238—241°) ohne Depression. $[\alpha]_D^{20} = -122,9^\circ$ ($c = 0,578$ in Chloroform)⁹⁾. Zur Analyse wurde die Substanzprobe 4 Std. im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

C ₂₂ H ₂₂ O ₈	Ber. C	63,76	H	5,35	O	30,89	(3)CH ₃ O	22,47%
(414,40)	Gef. „	63,76	„	5,51	„	30,65	„	22,43%

Die *Liebermann*-Reaktion zeigte eine intensive violette Färbung. Bei der *Keller-Kiliani*-Reaktion trat an der Berührungsfläche der beiden Schichten ein tiefblauer Ring auf.

UV.-Spektrum: $\lambda_{\max} = 275 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,26$).

Das Aglykon stimmt in den Daten mit dem in der Literatur beschriebenen β -Peltatin überein³⁷⁾. Zur weiteren Charakterisierung wurde es in das Acetylderivat übergeführt: 170 mg β -Peltatin wurden mit 5 cm³ Essigsäureanhydrid 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wurde im Vakuum konzentriert und mit 50 cm³ Wasser versetzt. Nach 1 Std. filtrierte man von den abgeschiedenen Kristallen ab. Das Acetylderivat wurde durch Umkristallisieren aus abs. Alkohol in weissen Plättchen vom Smp. 231—232° gewonnen; Misch-Smp. mit Acetyl- β -peltatin (Smp. 231—232°) ohne Depression. $[\alpha]_D^{20} = -128,6^\circ$ ($c = 0,692$ in Chloroform). — Zur Analyse wurde 6 Std. bei 95° im Hochvakuum getrocknet.

C ₂₄ H ₂₄ O ₉	Ber. C	63,15	H	5,30	O	31,55	(3)CH ₃ O	20,40%
(456,43)	Gef. „	62,99	„	5,33	„	31,29	„	20,50%

Identifizierung des Zuckers als D-Glucose durch Überführung in α -Methyl-D-glucosid<1,5>: Die vom Aglykon befreite wässrige Lösung wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 50 cm³ 80-proz. Methanol aufgenommen und die trübe Lösung durch Talk filtriert. Das Filtrat dampfte man ein, löste den Rückstand mit 1 cm³ Wasser zu einem Sirup auf, aus welchem sich durch Zugabe von 49 cm³ Methanol eine flockige Fällung abschied, die durch Filtration durch eine dünne Talkschiicht entfernt wurde. Das vollständig klare Filtrat hinterliess beim Eindampfen einen farblosen Sirup, der *Fehling*-Lösung reduzierte. Der Sirup wurde über P₂O₅ scharf getrocknet und anschliessend mit 50 cm³ normaler abs. methanolischer Salzsäure 15 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Neutralisieren mit frisch gefälltem Silbercarbonat und Abtrennen der Silbersalze wurde das Filtrat eingedampft. Den verbleibenden gelben Sirup nahm man in 10 cm³ Methanol-Aceton (1:1) auf, wobei noch etwas anorganisches Material ungelöst zurückblieb. Die geklärte Lösung wurde eingedampft und der gelbe sirupöse Rückstand mit wenigen Tropfen Methanol versetzt und durch Animpfen mit α -Methyl-D-glucosid<1,5> zur Kristallisation gebracht. Die abgeschiedenen farblosen Prismen wurden zur Reinigung im Hochvakuum sublimiert und noch einmal aus Methanol-Aceton (1:1) umkristallisiert. Man gewann 50 mg stäbchenförmige Kristalle vom Smp. 168—169°; Misch-Smp. mit authentischem α -Methyl-D-glucosid<1,5> ohne Depression; $[\alpha]_D^{20} = +165,5^\circ$ ($c = 0,532$ in Methanol).

c) 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid (X). 200 mg eines Präparates von 4'-Demethylpodophyllotoxin-glucosid (vgl. Abschnitt 1d), das aus den Spitzenfraktionen von Silicagelsäulen anfiel, wurden in 1 cm³ Aceton gelöst und die klar filtrierte Lösung unter Rühren in 10 cm³ Äther eingespritzt. Die ausgeschiedenen weissen Flocken ergaben nach dem Trocknen ein amorphes Pulver vom Smp. 165—170°; $[\alpha]_D^{20} = -74,6^\circ$

³⁷⁾ J. L. Hartwell & W. E. Detty⁹⁾ gaben an: β -Peltatin: Smp. 231,1—238°; $[\alpha]_D^{20} = -119^\circ$ (in Chf); Acetyl- β -peltatin: Smp. 229,4—231,6°; $[\alpha]_D^{20} = -122^\circ$ (in Chf).

($c = 0,569$ in Methanol) und $[\alpha]_D^{20} = -120,8^{\circ}$ ($c = 0,489$ in Pyridin). Zur Analyse wurde das Präparat 15 Std. im Hochvakuum bei 95° getrocknet und im Schweinchen eingewogen.

$C_{27}H_{30}O_{13}$	Ber. C 57,65	H 5,38	(2)CH ₃ O 11,03%
(562,51)	Gef. „ 57,46	„ 5,70	„ 10,58%

UV.- und IR.-Spektren siehe theoret. Teil.

Für 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid aus *P. emodi* haben wir früher folgende Daten angegeben²³⁾: Smp. 165–170 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{20} = -81^{\circ}$ (in Methanol) und $[\alpha]_D^{20} = -123^{\circ}$ (in Pyridin).

Die physikalischen Daten der beiden Präparate aus *P. peltatum* und *P. emodi* stimmen weitgehend überein. Zur sicheren Identifizierung wurden aus dem amorphen Glucosid das Acetylderivat und die Picro-Verbindung bereitete und ausserdem noch ein enzymatischer Abbau mit Emulsin durchgeführt. Bei der Methylierung des Glucosids X mit Diazomethan entsteht Podophyllotoxin-glucosid (IX)³³⁾.

Acetylverbindung. 100 mg Glucosid wurden auf übliche Weise mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert. Die rohe Acetylverbindung, zweimal aus Methanol umkristallisiert, schmolz bei 167–169 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{20} = -76,2^{\circ}$ ($c = 0,72$ in Chloroform). Diese Werte stimmen mit den für das Pentaacetylderivat des 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosids angegebenen Daten²³⁾ überein; Misch-Smp. mit einem authentischen Vergleichspräparat ohne Depression.

Die folgenden Versuche wurden mit 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid, das aus *P. emodi* gewonnen worden war, durchgeführt, und bilden eine Ergänzung unserer vorläufigen Mitteilung²³⁾ über die Isolierung und Konstitutionsermittlung dieses Lignan-glykosids.

4'-Demethylpicropodophyllin- β -D-glucosid. Die Lösung von 500 mg 4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid in 25 cm³ Methanol kochte man nach Zugabe von 2,5 cm³ 25-proz. wässriger Ammoniaklösung 30 Min. am Rückfluss. Aus der gelb gefärbten Lösung schied sich die Picro-Verbindung erst beim Abkühlen als gallertige Masse ab. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen gewann man ein lockeres Pulver, das sich bei 268–278 $^{\circ}$ zersetzte. Das amorphe Präparat konnte aus wässrigem Alkohol in feinen, verfilzten Nadeln vom Smp. 274–278 $^{\circ}$ erhalten werden. $[\alpha]_D^{20} = -15,9^{\circ}$ ($c = 0,565$ in Pyridin). Zur Analyse trocknete man die Probe 6 Std. bei 100 $^{\circ}$ im Hochvakuum.

$C_{27}H_{30}O_{13}$	Ber. C 57,65	H 5,38	(2)CH ₃ O 11,03%
(562,51)	Gef. „ 57,49	„ 5,57	„ 10,73%

Enzymatische Hydrolyse mit Emulsin: Die Lösung von 1 g 4'-Demethylpodophyllotoxin-glucosid in 12,5 cm³ abs. Alkohol wurde mit der Lösung von 500 mg Emulsin in 250 cm³ 1/50 molar. Acetatspuffer (pH = 5,0) vermischt und bei 37 $^{\circ}$ gerührt. Nach einigen Std. war die anfänglich schwach opale Lösung deutlich trübe geworden. Nach 24 Std. filtrierte man den Niederschlag ab und kochte den Filtrückstand (90 mg) mit 10 cm³ abs. Alkohol aus. Die von ungelösten Anteilen befreite Alkohollösung hinterliess nach dem Eindampfen 50 mg kristallisiertes Aglykon.

Die wässrige Enzymlösung wurde erschöpfend mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus den Chloroformextrakten konnte insgesamt 550 mg kristallisiertes Aglykon erhalten werden. Aus der Ausbeute an Genin (total 600 mg) berechnete sich eine 84-proz. Spaltung des Glucosids.

Identifizierung des Aglykons als 4'-Demethylpodophyllotoxin (V): Das so gewonnene Aglykon wurde aus abs. Alkohol umkristallisiert und bildete weisse Blättchen vom Smp. 250–252 $^{\circ}$ (Sintern ab 246 $^{\circ}$); $[\alpha]_D^{20} = -131,1^{\circ}$ ($c = 0,503$ in Chloroform). Zur Analyse wurde das Präparat 3 Std. im Hochvakuum bei 95° getrocknet.

$C_{21}H_{20}O_8$	Ber. C 63,00	H 5,04	O 31,97	(2)CH ₃ O 15,50%
(400,37)	Gef. „ 63,03	„ 5,28	„ 31,80	„ 15,62%

³³⁾ A. Stoll, J. Rutschmann, A. von Wartburg & J. Renz, Helv. **39**, 993 (1956). Die Methylierung wurde zur Darstellung von ¹⁴C-Podophyllotoxin-glucosid ausgenutzt.

Das Aglykon gab mit wässriger FeCl_3 -Lösung eine rostrote, mit alkoholischer FeCl_3 -Lösung eine intensiv grüne Farbreaktion. Diazotierte p-Nitranilin-Lösung erzeugte eine orangerote Farbe.

Das UV.-Spektrum des Genins zeigte bei 292 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,75$) das charakteristische Maximum.

Das Aglykon erwies sich in allen Eigenschaften mit dem von *Hartwell et al.*¹³) beschriebenen 4'-Demethylpodophyllotoxin (V) identisch. Die im folgenden noch beschriebenen Derivate bestätigen die Identität.

Diacetylderivat von 4'-Demethylpodophyllotoxin. 150 mg Aglykon aus dem enzymatischen Abbau wurden in üblicher Weise mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert. Das Acetylderivat kristallisierte aus Alkohol in farblosen Prismen vom Smp. 230—231°; $[\alpha]_D^{20} = -130,4^0$ ($c = 0,698$ in Chloroform)¹³). Das Analysenpräparat wurde im Hochvakuum 3 Std. bei 100° getrocknet.

$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	Ber. C 61,98	H 4,99	(2) CH_3O 12,81	(2) CH_3CO 17,77%
(484,44)	Gef. „ 62,27	„ 5,12	„ 12,69	„ 16,42%

4'-Demethylpicropodophyllin. Zur Lösung von 250 mg Aglykon in 15 cm^3 Methanol wurden 1,5 cm^3 konz. wässrige Ammoniaklösung zugefügt. Das Gemisch wurde 30 Min. unter Rückfluss gekocht und dann mit 7,5 cm^3 Wasser verdünnt. Beim Abkühlen kristallisierte die Picro-Verbindung in feinen Nadelchen aus. Nach dem Umkristallisieren aus 75-proz. Methanol, Smp. 230—236°; im Hochvakuum bei 80° getrocknete Proben wiesen einen Smp. von 218—220° auf. $[\alpha]_D^{20} = +9,3^0$ ($c = 0,592$ in Aceton)¹³). Zur Analyse wurde 4 Std. im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_8$	Ber. C 63,00	H 5,04	O 31,97	(2) CH_3O 15,33%
(400,37)	Gef. „ 63,24	„ 5,30	„ 32,03	„ 15,66%

Identifizierung des Zuckers aus dem enzymatischen Abbau: Die nach der Extraktion des Aglykons verbleibende wässrige Lösung wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 80-proz. Methanol aufgenommen. Nach Abtrennen von unlöseligen Anteilen wurde zu einem Sirup eingedampft, welcher den freien Zucker enthielt. Dieser wurde durch 15stündiges Kochen mit normaler abs. methanolischer Salzsäure in das Methylglykosid übergeführt. Nach Neutralisation mit frisch gefälltem Silbercarbonat und Abtrennung der Silbersalze wurde die methanolische Lösung eingedampft. Der verbleibende gelbliche Sirup kristallisierte aus wenig Methanol in farblosen Prismen. Das Kristalliat wurde im Hochvakuum sublimiert und aus Methanol-Aceton umgelöst. Der Smp. des gereinigten Methylglykosids lag bei 168—170°; $[\alpha]_D^{20} = +165,9^0$ ($c = 0,663$ in Methanol). Das Präparat war mit α -Methyl-D-glucosid (1,5) identisch; die Zuckerkomponente des Glykosids war damit als D-Glucose gekennzeichnet.

d) α -Peltatin- β -D-glucosid (XII). Die Herstellung der angereicherten Glucosidpräparate ist bereits im Abschnitt 2 beschrieben. 1,6 g eines solchen Präparates wurde erneut an feuchtem Diatomitstein fraktioniert. Die Spitzenfraktionen liessen sich durch Anreiben mit Aceton zur Kristallisation bringen. Die bläulich gefärbten Kristalle wurden vereinigt, in Methanol gelöst und durch eine dünne Schicht alkalifreies Aluminiumoxyd filtriert. Nach dem Eindampfen des Filtrates konnten beim Anreiben des entstandenen Schaumes mit Aceton weisse prismatische Nadeln von α -Peltatin- β -D-glucosid gewonnen werden. Nach Umkristallisieren aus Aceton, Smp. 168—171°; $[\alpha]_D^{20} = -128,9^0$ ($c = 0,590$ in Methanol) und $[\alpha]_D^{20} = -174,4^0$ ($c = 0,579$ in Pyridin). Die anfallenden Mutterlaugen lieferten durch erneute Chromatographie und Kristallisation aus Aceton eine weitere Menge dieses Glucosides. Zur Analyse wurde die Substanz 15 Std. im Hochvakuum bei 95° getrocknet und im Schweinchen eingewogen.

$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$	Ber. C 57,65	H 5,38	O 36,98	(2) CH_3O 11,03%
(562,51)	Gef. „ 57,77	„ 5,50	„ 37,08	„ 10,93%
	„ 57,66	„ 5,41	„	„ 10,84%

Farbreaktionen und UV.-Spektrum siehe theoret. Teil.

Pentaacetyl- α -peltatin- β -D-glucosid. 500 mg Glucosid wurden mit 2,5 cm³ Pyridin und 5 cm³ Essigsäureanhydrid über Nacht stehengelassen. Die Reaktionslösung goss man in 200 cm³ Wasser. Nach ca. 3 Std. filtrierte man die ausgeschiedenen Flocken ab und nahm das rohe Acetylderivat in Chloroform auf. Die Chloroformlösung wurde zweimal mit wenig Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand kristallisierte aus Methanol in schlanken weissen Prismen (570 mg) vom Smp. 222–223°; $[\alpha]_D^{20} = -96,0^{\circ}$ ($c = 0,625$ in Chloroform). Das Analysenpräparat wurde 6 Std. bei 95° im Hochvakuum getrocknet.

C ₃₇ H ₄₀ O ₁₈	Ber. C 57,51	H 5,22	O 37,27	(2)CH ₃ O 8,03	(5)CH ₃ CO 27,85%
(772,69)	Gef. ,, 57,30	,, 5,46	,, 37,04	,, 7,98	,, 27,60%

Enzymatischer Abbau von α -Peltatin- β -D-glucosid (XII): Die Lösung von 1 g α -Peltatin- β -D-glucosid in 12,5 cm³ abs. Alkohol wurde mit der klar filtrierten Lösung von 500 mg Emulsin in 250 cm³ 1/50-m. Acetatpuffer von pH 5,1 versetzt. Nach Zugabe von 2,5 cm³ Toluol wurde die klare Lösung 28 Std. bei 37° gerührt. Nach ca. 1 Std. begann die Abscheidung des Aglykons als feine Trübung; mit der Zeit ging diese in eine kristallisierte Ausfällung über. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in 100 cm³ Chloroform aufgenommen. Von wenigen ungelösten Flocken filtrierte man ab und dampfte das Filtrat ein. Das Aglykon wurde in Form eines weissen Schaumes (630 mg) erhalten und kristallisierte aus wenig Alkohol in farblosen Prismen. Aus der wässrigen Fraktion konnten nach Ausschütteln mit Chloroform noch 50 mg ebenfalls kristallisiertes Aglykon gewonnen werden. — Isolierung des abgespaltenen Zuckers aus der wässrigen Phase siehe unten.

Identifizierung des Aglykons als α -Peltatin (IV): Das bei der enzymatischen Spaltung gewonnene Aglykon (total 680 mg) wurde zweimal aus abs. Alkohol umkristallisiert: weisse, prismatische Blättchen vom Smp. 242–246° (Sintern ab 236°). Ein durch Umkristallisation aus Alkohol gereinigtes α -Peltatin-präparat²⁷⁾ zeigte ebenfalls den Smp. 242–246° und ergab in der Mischprobe keine Depression. $[\alpha]_D^{20} = -124,8^{\circ}$ ($c = 0,500$ in Chloroform⁹⁾). Das Analysenpräparat wurde 3 Std. im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

C ₂₁ H ₂₀ O ₈	Ber. C 63,00	H 5,04	O 31,97	(2)CH ₃ O 15,50%
(400,37)	Gef. ,, 62,98	,, 5,06	,, 31,81	,, 15,69%

UV.-Spektrum siehe theoret. Teil.

Diacetyl- α -peltatin. 220 mg des aus der enzymatischen Spaltung erhaltenen α -Peltatins wurden mit 3 cm³ Pyridin und 1,5 cm³ Essigsäureanhydrid über Nacht stehengelassen. Die Reaktionslösung goss man auf 100 cm³ Wasser und filtrierte nach 4 Std. die ausgeschiedenen weissen Flocken ab. Die rohe Acetylverbindung wurde in Chloroform aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen und Eindampfen der Chloroformphase gewann man 210 mg farblosen Schaum, der beim Versetzen mit abs. Alkohol sofort durchkristallisierte. Zweimaliges Umkristallisieren aus abs. Alkohol führte zu weissen Prismen vom Smp. 233–234°. Ein aus authentischem α -Peltatin²⁷⁾ bereitetes Derivat schmolz ebenso und ergab keine Schmelzpunktsdepression bei der Mischprobe. $[\alpha]_D^{20} = -113,3^{\circ}$ ($c = 0,597$ in Chloroform⁹⁾). Zur Analyse wurde 3 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	Ber. C 61,98	H 4,99	O 33,03	(2)CH ₃ O 12,81	(2)CH ₃ CO 17,77%
(484,44)	Gef. ,, 62,10	,, 5,12	,, 32,84	,, 12,86	,, 17,58%

Identifizierung des Zuckers als D-Glucose durch Überführung in α -Methyl-D-glucosid(1,5): Die wässrige, vom Aglykon befreite Lösung und die Waschwasser wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne verdampft. Den Rückstand nahm man in 20 cm³ 50-proz. Methanol auf und filtrierte die trübe Lösung durch Talk. Das blanke Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand in 5 cm³ Wasser gelöst. Durch Zusatz von 45 cm³ Methanol wurden weisse Flocken ausgefällt, die durch Filtration entfernt wurden. Die klare Lösung wurde verdampft und der sirupöse Rückstand bei 60° über P₂O₅ scharf getrocknet und anschliessend 16 Std. mit 75 cm³ normaler abs. methanolischer Salzsäure unter Rückfluss gekocht. Man neutralisierte mit frisch gefälltem Silber-

carbonat, entfernte die schwerlöslichen Silbersalze und dampfte das Filtrat ein. Den Rückstand nahm man in 10 cm³ Methanol auf, filtrierte von ungelösten Anteilen ab und brachte die Methanollösung zur Trockne. Es wurde ein gelber Sirup erhalten, welcher beim Impfen mit α -Methyl-D-glucosid<1,5> in farblosen Prismen kristallisierte. Die Kristalle wurden durch Hochvakuumsublimation gereinigt und aus Methanol-Aceton (1:1) umkristallisiert. Man gewann 100 mg farblose, zu Rosetten angeordnete Prismen vom Smp. 168 bis 169°; Misch-Smp. mit α -Methyl-D-glucosid<1,5> ebenso. $[\alpha]_D^{20} = +163,8^{\circ}$ ($c = 0,628$ in Methanol).

Überführung von α -Peltatin- β -D-glucosid (XII) in β -Peltatin- β -D-glucosid (XI): Zur Lösung von 1 g α -Peltatin- β -D-glucosid (XII) in 50 cm³ Methanol destillierte man eine frisch bereitete, trockene ätherische Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung. Nach zweistündigem Stehen bei 0° wurden die Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Den Rückstand vermengte man mit 60 g Diatomitstein und 20 cm³ Wasser und beschickte mit dieser Mischung eine 4-m-Säule aus angefeuchtetem Diatomitstein (1400 g Trägermaterial + 425 cm³ Wasser). Die Elution nahm man mit wassergesättigtem Essigester vor (Tab. 7).

Tabelle 7.

Fraktion	Lösungsmittel je 100 cm ³	Rückstand mg	Bemerkungen
1	Essigester wassergesättigt	20	<i>Liebermann:</i> blau-lila; FeCl ₃ -Reaktion: negativ: β -Peltatin-glucosid
2	Essigester wassergesättigt	20	
3	Essigester wassergesättigt	—	
4	Essigester wassergesättigt	30	
5	Essigester wassergesättigt	70	
6	Essigester wassergesättigt	140	
7	Essigester wassergesättigt	170	
8	Essigester wassergesättigt	170	
9	Essigester wassergesättigt	110	
10	Essigester wassergesättigt	80	
11	Essigester wassergesättigt	20	
12	Essigester wassergesättigt	10	
13—20	Essigester wassergesättigt	40	

Die Spitzenfraktionen 4—11 wurden vereinigt, in 7,5 cm³ Aceton gelöst und das Glucosid mit 75 cm³ Äther ausgefällt. Nach dem Trocknen gewann man ein lockeres, weisses Pulver (650 mg) mit einem Zersetzungspunkt bei 154—156°; $[\alpha]_D^{20} = -122,4^{\circ}$ ($c = 0,588$ in Methanol) und $[\alpha]_D^{20} = -169,4^{\circ}$ ($c = 0,679$ in Pyridin). Misch-Smp. mit einem am Silicagel gereinigten β -Peltatin- β -D-glucosid-Präparat (XI) vom Smp. 154—156° ohne Depression. Zur Analyse wurde die Substanzprobe 15 Std. im Hochvakuum bei 95° getrocknet und im Schiffchen zur Gewichtskonstanz gewogen.

$C_{28}H_{32}O_{13}, 1 H_2O$ Ber. C 56,56 H 5,76 (3)CH₃O 15,66%
(594,55) Gef. „ 56,63 „ 5,90 „ 15,58%

Nachtrocknung bei 95° im Hochvakuum und Einwage im Schweinchen ergab folgende Werte:

$C_{28}H_{32}O_{13}, \frac{1}{2} H_2O$ Ber. C 57,43 H 5,68 (3)CH₃O 15,90%
(585,54) Gef. „ 57,42 „ 5,60 „ 15,66%

Die physikalischen und chemischen Daten des Methylierungsproduktes stimmen mit den oben genannten Angaben für das β -Peltatin-glucosid (XI) überein. Auch die charakteristischen Farbreaktionen fallen gleich aus wie für β -Peltatin- β -glucosid. Im UV.-Spektrum ist ein Maximum bei 280 m μ ($\log \epsilon = 3,42$) zu erkennen.

4. Nachweis und Bestimmung der Lignanglucoside.

a) Chromatographie an Silicagelsäulen: Die Herstellung des Silicage's und die Ausführung der Chromatographien wurden in einer früheren Mitteilung²³⁾ ausführlich beschrieben. Zur Analyse der Lignanverbindungen benutzten wir in der Regel Säulen aus 36 g Silicagel (trocken oder wassergesättigt), an denen sich 50–100 mg Reinsubstanz oder Gemische gut bestimmen liessen. Die Präparate wurden entweder in trockener Form mit wenig Silicagel vermischt oder gelöst in 0,5 cm³ Methanol oder Chloroform auf die Säule gebracht. Zur Elution waren je nach Säulentyp trockene oder wassergesättigte Lösungsmittel geeignet, vorzugsweise Chloroform, Essigester oder Isopropylacetat, evtl. mit Zusätzen bis zu 5% Alkohol oder Methanol.

Nach dieser Methode lassen sich die 4 hier beschriebenen Glucoside aus *P. peltatum* nebeneinander nachweisen und auch von den Aglykonen trennen. Entsprechende Kurvenbilder, die mit einem rohen Glucosidpräparat oder auch mit Mischungen von gereinigten Glucosiden erhalten wurden, sind im allgemeinen Teil wiedergegeben.

b) Papierchromatographie: Die Papierchromatographie der Lignanglucoside wurde nach dem von Kaiser³⁰⁾ zur Trennung von Herzglykosiden entwickelten Verfahren ausgeführt. Wir verwendeten mit Formamid imprägniertes *Whatman*-Papier (Nr. 1 u. 3) und als mobile Phase Chloroform-Tetrahydro-furan-Formamid (50:50:6,5). Zur Lokalisierung der Glucoside besprühten wir mit dem von Jørgensen & Kofod²⁴⁾ angegebenen SbCl₅-Reagens.

c) Ausführung der Farbreaktionen: *Keller-Kiliani*-Reaktion: 5 mg Substanz wurden im Reagenzglas in 5 cm³ Eisessig gelöst, mit 2 Tropfen einer 5-proz. FeCl₃-Lösung vermischt und mit 2 cm³ konz. Schwefelsäure sorgfältig unterschichtet. Optimale Farbentwicklung nach ca. 30 Min.

Liebermann-Reaktion: Man löste 5 mg Substanz in 5 cm³ reinstem Essigsäureanhydrid, setzte 1–2 Tropfen konz. Schwefelsäure dazu und schüttelte kurz durch. Farbe nach 10, 20 und 60 Min. beobachten.

Eisenchlorid-Reaktion: 5 mg Substanz werden in 1 cm³ Alkohol oder Wasser gelöst und mit 1–2 Tropfen einer 5-proz. alkoholischen bzw. wässrigen FeCl₃-Lösung versetzt. Momentaner Farbumschlag.

SUMMARY.

From the rhizomes of american *Podophyllum peltatum* L. it was possible to isolate and characterize four lignan glucosides with anti-mitotic activity: podophyllotoxin- β -D-glucoside (IX), β -peltatin- β -D-glucoside (XI), 4'-demethylpodophyllotoxin- β -D-glucoside (X) and α -peltatin- β -D-glucoside (XII). The constitution of β -peltatin- β -D-glucoside was deduced from the fact that enzymatic cleavage with emulsin yielded D-glucose and the already known β -peltatin. α -Peltatin- β -D-glucoside, the first native glucoside of podophyllum to be isolated in crystalline form, breaks down to D-glucose and α -peltatin on hydrolysis with emulsin. The position of the sugar component in 4'-demethylpodophyllotoxin- β -D-glucoside and in α -peltatin- β -D-glucoside could be determined by methylation to podophyllotoxin- β -D-glucoside and β -peltatin- β -D-glucoside.

Distribution chromatography of the lignan glucosides on columns of silicagel proved a reliable analytical procedure. It could be used both as a test of purity and for assaying enriched fractions and crude plant extracts.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium *Sandoz*, Basel.