

Je 5 ml der Milchsaftlösungen wurden vorsichtig in Reagensgläser pipettiert und in diese je ein Thermometer gesteckt. Die Gläser wurden bis zu $\frac{3}{4}$ in ein Wasserbad gestellt und häufig langsam bewegt. Nach der Versuchszeit wurden sie in Eiswasser auf 20° abgekühlt und sofort zur Bestimmung der Peroxydase-Aktivität verwendet.

Darstellung der Bitterstoffe

20 g Latucylpulver wurden mit 120 g Seesand verrieben und 30 Stunden mit durch Natriumsulfat getrocknetem Chloroform im Schliffoxleth extrahiert, der durch ein Calciumchloridrohr gegen Feuchtigkeitzutritt geschützt war. Die im Lösungsmittel abgesechene hellbraune Masse (1,5 g) wurde im Trockenschrank bei 60° getrocknet, im Mörser fein gerieben und mit kaltem Wasser angerührt. Die Anschwemmung wurde in 1500 ml Wasser gegeben, das sich kurz vor dem Sieden befand. Die trübe Mischung wurde dann im Wasserbad zirka 10 Minuten unter Umrühren erhitzt und heiß filtriert. Das klare Filtrat trübte sich beim Erkalten und wurde bis zum anderen Tag in den Eisschrank gestellt. Die abgesaugten Kristalle (0,55 g) hatten nach eintägigem Stehen im Exsikkator einen Schmp. von 140°. Durch mehrmaliges Umkristallisieren, wobei die Substanz in der 100fachen Menge heißen Wassers gelöst wurde und wie oben weiter behandelt wurde, stieg der Schmp. auf 148–149° (Mikro-Schmp.). Durch weiteres Umkristallisieren mit Wasser, Chloroform oder Benzol veränderte sich der Schmp. nicht, ebensowenig durch Erhitzen der Substanz in der Trockenpistole über P_2O_5 auf 120°.

Das oben erhaltene Filtrat von den zum erstenmal im Eisschrank ausgeschiedenen Lactucopikrin-Kristallen wurde auf dem Wasserbad bis fast auf 150 ml eingengt. Beim Erkalten schieden sich gelbbraune Kristalle ab, die abgesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen wurden (0,15 g). Das Roh-Lactucin wurde in der 100fachen Menge heißen Wassers gelöst und filtriert. Im Eisschrank schieden sich Kristalle vom Schmp. 209–215° ab. Mit Zink und Salzsäure behandelt, gaben Mengen von 0,1 mg eine stark rotviolette Farbe, wie sie in der Mitteilung⁴⁾ als charakteristisch für Lactucin angegeben ist. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Wasser wurde der Schmp. bei 214–218,5° gefunden. Anschließend wurde dreimal aus Methanol und einmal aus Dioxan umgelöst. Der Schmp. lag dann bei 224–228° (Mikro-Schmp.).

1216. Carl Heinz Brieskorn und Karl Hermann Eberhardt

Die Oxytriterpensäuren des Salbeis

9. Mitteilung über die Inhaltsstoffe von *Salvia officinalis* L.

Aus dem Institut für Galenische Pharmazie der Universität Istanbul und dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München

(Eingegangen am 11. Dezember 1952)

Durch unsere bisherigen Untersuchungen wurde gezeigt, daß sich die Terpensynthese bei den Labiaten nicht mit der Bildung von Mono- und Sesquiterpenen erschöpft, sondern auch ein Triterpen — die Ursolsäure — aufgebaut wird¹⁾. Wir konnten weiter wahrscheinlich machen, daß die Bildung und der Gehalt an Ursolsäure in einem Zusammenhang mit der Menge des ätherischen Öles stehen²⁾. Zur Erhärtung dieser Beobachtung sollte geprüft werden, wie weit die Labiaten noch weitere, nicht wasserdampfvlüchtige Triterpene synthetisieren.

¹⁾ C. H. Brieskorn und L. Schlumprecht, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharm. Ges. 284/56, 239 (1951).

²⁾ C. H. Brieskorn, M. Briner, L. Schlumprecht und K. H. Eberhardt, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharm. Ges. 285/57, 290 (1952).

Die Ausführung dieser Untersuchungen erfolgte zunächst an Salbeiblättern, da die Isolierung der Ursolsäure aus dieser Labiate besonders gut und in reichlicher Ausbeute möglich war.

Ausgangsmaterial waren die dunkelgrünen Chloroform-Waschflüssigkeiten, die bei der Isolierung der Ursolsäure anfielen¹⁾. Sie wurden zur Trockene eingengt. Beim Digerieren des erkalteten Rückstandes mit Äther lösten sich die gefärbten Anteile leicht und vollständig heraus. Es blieb ein weißliches Pulver zurück, das sich harzig anfühlte und eine positive Reaktion nach *Liebermann-Storch-Morawski* auf Triterpene gab. Wurde dieses Pulver in wenig 96%igem Äthanol heiß gelöst, so schieden sich nach dem Erkalten kleine, schön ausgeprägte Kristallnadeln ab. Ihr Schmelzpunkt von 285° (korr.) ließ eine Identität mit Ursolsäure vermuten. Die Schmelzpunkte des Acetylestere und des Methylestere dieser Verbindung stimmten mit den entsprechenden Derivaten der Ursolsäure überein; im Mischschmelzpunkt ergab sich keine Depression. Im polarisierten Licht zeigte die isolierte Substanz dagegen eine um rund 10% höhere spezifische Drehung als Ursolsäure.

Die Derivate dieser neuen Verbindung wiesen Mutarotation auf. Die spezifische Drehung lag nach dem Lösen niedriger, erreichte dann nach 15 Minuten den Wert der Literaturangaben für Ursolsäure³⁾ und vergrößerte sich im Laufe der folgenden 15 Minuten noch um einen geringen Betrag. Die Versuchsergebnisse zeigten weiter, daß auch die Löslichkeit der beiden Substanzen in Alkohol und Chloroform verschieden ist. Wurden Salbeiblätter im Soxleth mit Äthanol ausgezogen, jeder Überlauf getrennt aufgefangen und die beiden „Ursolsäuren“ unter gleichen Versuchsbedingungen jeweils quantitativ ermittelt, so ergab sich folgendes Kurvenbild (Abb. 1).

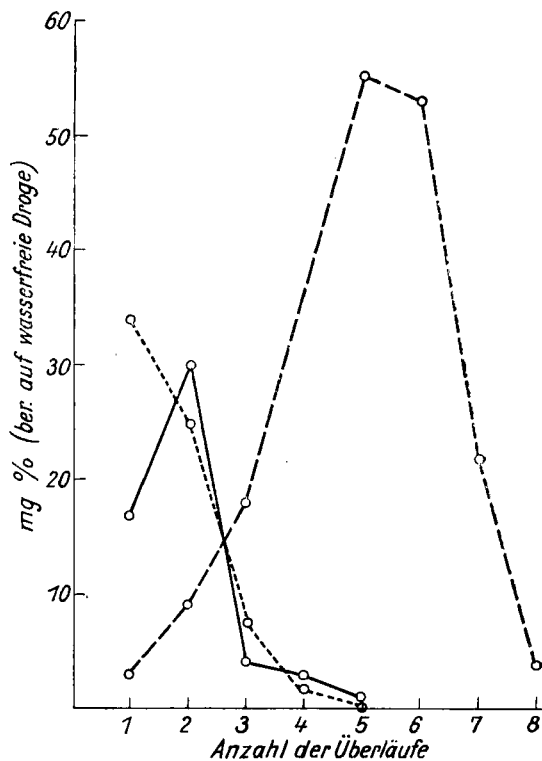


Abb. 1. Verhältnis von Ursolsäure (I), Ursolsäure (II) und Oleanolsäure bei einzelnen Soxlethüberläufen

Ursolsäure (I) — — — — —
 Ursolsäure (II) —————
 Oleanolsäure ·········

³⁾ Th. Bersin und A. Müller, *Helv. chim. Acta* 34, 1868 (1951).

Für diesen Versuch fanden ausgewählte Blätter von Salbeipflanzen Verwendung, die im Versuchsgarten⁴⁾ gezo-gen worden waren. Die Ernte fand im Mai statt, nachdem frühere Untersuchungen²⁾ ergeben hatten, daß während dieses Monates der Ursolsäuregehalt ein Maximum erreicht.

Die Auswertung der in Abb. 1 gezeigten Kurven ergibt, daß die Extraktion der Ursolsäure aus der Droge während der ersten beiden Überläufe stark behindert ist, was auf ihre chemische Bindung in der Pflanze hindeutet. Durch die Alkoholeinwirkung scheint diese Bindung gelöst zu werden, da die Ausbeute vom dritten Überlauf an größer wird, um ihr Maximum dann beim fünften Überlauf zu erreichen. Die neu isolierte Substanz wird dagegen beim ersten Überlauf in sechsmal höherer Konzentration als Ursolsäure herausgelöst und findet bereits beim zweiten Überlauf den höchsten Wert.

Auf Grund des gleichen chemischen, aber verschiedenen physikalischen Verhaltens bezeichnen wir diese Verbindung als Ursolsäure (II).

Bei der Suche nach weiteren Triterpenen wurde von der ätherischen Lösung ausgegangen, die in dem oben geschilderten Versuch bei der Isolierung der Ursolsäure (II) angefallen war. Der Rückstand dieser Lösung ließ sich durch andere organische Lösungsmittel nicht weiter aufteilen. Deshalb versuchten wir eine direkte Ausschüttelung mit Flüssigkeiten, die mit Äther nicht mischbar sind. Während dieses Verfahren mit verdünnter Schwefelsäure keine Ergebnisse zeigte, lösten sich bei Anwendung von 5%iger Natriumbikarbonat-, 5%iger sekundärer Natriumphosphatlösung oder 5%iger Kalilauge sofort rotgefärbte Anteile aus dem Äther heraus. Aus der mit Kalilauge erhaltenen Ausschüttelung schieden sich nach eintägigem Stehen Kristalle ab, die eine positive Reaktion auf Triterpene nach *Liebermann-Storch-Morawski* gaben. Der Schmelzpunkt lag bei 308—309° (korr.). Die leichte Löslichkeit der Kristalle in alkoholischer Kalilauge und in Pyridin deutete auf einen Säurecharakter hin. Die Vermutung, daß es sich bei dieser Verbindung um Oleanolsäure handeln könnte, wurde durch das übereinstimmende Verhalten der Schmelz- und Mischschmelzpunkte, sowie der Verbrennungswerte einer aus Gewürznelken⁵⁾ hergestellten Oleanolsäure bewiesen. Auch im Verhalten der Methyl-, Acetyl- und Methylacetyl-derivate zeigte sich Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur⁶⁾.

Salbei ist damit eine weitere Droge, aus der das Sapogenin Oleanolsäure in nicht gebundenem Zustand isoliert werden kann⁷⁾. Bei der Extraktion aus der Droge war die Hauptmenge dieser Verbindung bereits im ersten Überlauf enthalten (s. Abb. 1).

An *Salvia officinalis* zeigt sich sehr eindrucksvoll, mit welcher Mannigfaltigkeit die Pflanze Terpenverbindungen aufzubauen vermag. Sie begnügt sich hier nicht —

⁴⁾ Herrn Regierungsrat Dr. *Steigerwaldt* vom Staatl. Versuchsgarten Holzapfelskreuth, München, sei auch an dieser Stelle für sein großes Entgegenkommen aufrichtigst gedankt.

⁵⁾ *K. H. Eberhardt*, Dissertation München 1952, noch unveröffentlicht.

⁶⁾ *F. D. Dodge* und *F. Tutin*, *J. Americ. chem. Soc.* **40**, 1917 (1918) und **52**, 1722 (1950).

⁷⁾ *F. B. Power* und *F. Tutin*, *J. chem. Soc. transact.* **93**, 891 (1908); *Ch. E. Sando*, *J. biol. Chemistry* **56**, 457 (1923); *A. Winterstein* und *W. Haemmerle*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **199**, 56 (1931).

wie bei anderen Pflanzen — mit nur einer Oxytriterpensäure, sondern läßt neben Ursolsäure noch Oleanolsäure und eine löslichere Form der Ursolsäure entstehen. Die Mengenverhältnisse wechseln je nach der Qualität des Salbeis, die prozentuale Zusammensetzung bleibt jedoch annähernd gleich (s. Tab. 1). Hierin wird eine Berechtigung für die Annahme gesehen, daß die Entstehung der Oxytriterpensäuren ein streng gesteuerter, wahrscheinlich fermentativer Vorgang ist.

Tabelle 1

Verhältnis von Ursolsäure (I), Ursolsäure (II) und Oleanolsäure
in verschiedenen Salbeiprobe des Handels

Probe Nr.	Ursolsäure I		Ursolsäure II		Oleanolsäure	
	gr	Anteil %	gr	Anteil %	gr	Anteil %
1	3,77	79,4	0,47	9,9	0,51	10,7
2	1,97	77,0	0,28	10,9	0,31	12,1
3	1,59	78,3	0,20	9,9	0,24	11,8

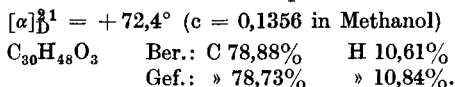
Das gemeinsame Vorkommen von Ursolsäure und Oleanolsäure in einer Pflanze ist bisher nur von *Vitis vinifera*⁸⁾, *Thymus vulgaris*⁹⁾ und *Crataegus oxyacantha*¹⁰⁾ bekannt.

Der Gesamtgehalt an Oxytriterpensäuren in Handelssalbei liegt durchweg höher als der Gehalt an ätherischem Öl, welcher nach unseren Untersuchungen bis zu 1,5% gefunden wurde²⁾. In dieser Prozentangabe sind jedoch auch andere Bestandteile enthalten, da sich das ätherische Öl nicht nur aus Terpenen zusammensetzt. Hieraus ergibt sich, daß in *Salvia officinalis* die Synthese von Terpenen eindeutig in Richtung der höhermolekularen Verbindungen verläuft.

Beschreibung der Versuche

Isolierung der Ursolsäure (II)

Die vereinigten Chloroform-Waschflüssigkeiten¹⁾ wurden auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingeeengt. Eine Nachtrocknung erfolgte bei 80° im Trockenschrank bis zum Verschwinden des Chloroformgeruches. Durch dreimaliges Ausziehen mit je 50 ml Äther ließen sich aus dem Rückstand sämtliche gefärbten Anteile herauslösen, und es hinterblieb eine nur noch schwach grün gefärbte Masse. Sie wurde in einer 2%igen methylalkoholischen Kalilauge unter Rückfluß 30 Min. zum Sieden erhitzt und die noch heiße Lösung sofort filtriert. Bei tropfenweiser Zugabe von 10%iger Schwefelsäure zu der erkalteten Flüssigkeit bildete sich ein weißer Niederschlag und die Farbe der Lösung änderte sich von rot nach gelbgrün. Durch Zusatz von 500 ml Wasser traten Vermehrung und langsames Absetzen des Niederschlages ein. Dieser wurde abgenutscht, bei 105° getrocknet und aus 96%igem Alkohol umkristallisiert. Schmp. 284,5–285°¹¹⁾.



⁸⁾ K. S. Markley, Ch. E. Sando und S. Hendricks, J. biol. Chemistry 123, 641 (1938); S. Kuwada und T. Matsukawa, J. pharmac. Soc. Japan 53, 368 (1933).

⁹⁾ E. J. Rowe, J. E. Orr, A. H. Uhl und L. M. Parks, J. Amer. pharm. Assoc. 38, 122 (1949).

¹⁰⁾ Th. Bersin und A. Müller, Helv. chim. Acta 35, 1891 (1952).

¹¹⁾ Alle Schmelzpunktwerte sind korrigiert.

Acetyl-ursolsäure

0,2 g der Kristalle vom Schmp. 285° wurden mit 8 ml frisch destillierten Acetanhydrids auf dem Ölbad unter Rückfluß 90 Min. lang zum Sieden erhitzt. Nach dem Eingießen der noch warmen Lösung in 25 ml Wasser schieden sich beim Stehen feine, glänzende Nadeln ab. Schmp. 286°.

	Sofort	Nach 15 Min.	Nach 30 Min.
$[\alpha]_D^{21} =$	+ 62,5°	+ 68,0°	69,1°

(c = 0,1176 in Chloroform)

$C_{32}H_{50}O_4$	Ber.: C 77,06%	H 10,11%
	Gef.: » 76,96%	» 10,07%

Ursolsäure-methylester

0,5 g der Kristalle vom Schmp. 285° wurden in 25 ml n/1 methylalkoholischer Kalilauge gelöst und unter Umschütteln tropfenweise mit frisch destilliertem Dimethylsulfat versetzt bis die Lösung sauer reagierte. Durch langsame Zugabe von Wasser erstarrte die Lösung zu einem dicken, weißen Kristallbrei. Dieser wurde abgenutscht, mit 2%iger KOH und Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen und dann in heißem 96%igem Äthanol gelöst. Bei Zugabe von Wasser bis zur gerade beginnenden Trübung schieden sich aus der Lösung feine, lange Nadeln ab. Schmp. nach Trocknung bei 105°: 169–170°.

	Sofort	Nach 15 Min.	Nach 30 Min.
$[\alpha]_D^{21} =$	+ 62,7°	+ 69,1°	+ 70,3°

(c = 0,1068 in Chloroform)

$C_{31}H_{50}O_3$	Ber.: C 79,08%	H 10,71%
	Gef.: » 78,84%	» 10,85%

Acetyl-ursolsäure-methylester

0,2 g des Methylesters (Schmp. 169–170°) wurden mit 8 ml frisch destillierten Acetanhydrids 60 Min. unter Rückfluß auf dem Ölbad zum Sieden erhitzt und noch warm in 40 ml Wasser eingegossen. Beim Stehen über Nacht hatten sich aus der Acetanhydridschicht stäbchenförmige Kristalle gebildet, die aus wenig Äthanol umkristallisiert wurden. Schmp. nach Trocknung bei 105° 244–245°.

	Sofort	Nach 15 Min.	Nach 30 Min.
$[\alpha]_D^{21} =$	+ 60,7°	+ 65,9°	+ 66,8°

(c = 0,1346 in Chloroform)

$C_{35}H_{52}O_4$	Ber.: C 77,29%	H 10,22%
	Gef.: » 76,84%	» 9,84%

Isolierung der Oleanolsäure

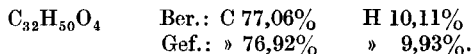
Die bei der Darstellung der Ursolsäure (II) angefallene, dunkelgrüne Ätherlösung wurde 5mal mit je 20 ml 1,5%iger KOH ausgeschüttelt. Dabei schieden sich an der Phasengrenze Mikrokrystalle ab. Die rotgefärbten, vereinigten Lösungen blieben über Nacht zum Verdunsten des Äthers stehen, wobei sich die kristalline Abscheidung noch vermehrte. Zum Nachwaschen der abfiltrierten Substanz diente zuerst 5%ige Schwefelsäure und anschließend heißes Wasser. Nach dem Trocknen des Rückstandes bei 105° wurde dieser noch mit heißem Petroläther gewaschen, da nach unseren Beobachtungen hierdurch eine reinere Oleanolsäure erhalten werden konnte. Das Umkristallisieren erfolgte aus wenig heißem Äthanol und Zusatz von Wasser bis zur gerade beginnenden Trübung. Beim Abkühlen schieden sich aus der Lösung feine Nadeln ab. Schmp. 306–308°.

$[\alpha]_D^{21} =$	+ 73,8°	(c = 0,1506 in Methanol)
---------------------	---------	--------------------------

$C_{30}H_{48}O_3$	Ber.: C 78,88%	H 10,61%
	Gef.: » 78,76%	» 10,47%

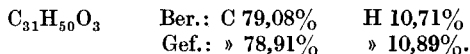
Acetyl-oleanolsäure

0,5 g der Kristalle vom Schmp. 306—308° wurden mit 20 ml frisch destillierten Acetanhydrids auf dem Ölbad unter Rückfluß 120 Min. zum Sieden erhitzt. Nach dem Eingießen der noch warmen Lösung in 100 ml Wasser kristallisierten beim Stehen über Nacht feine Nadeln aus. Sie wurden mit einer Wasser-Alkoholmischung 1 : 1 gewaschen und dann aus 80%igem Alkohol umkristallisiert. Schmp. 265,5°.



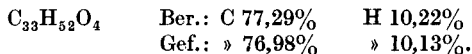
Oleanolsäure-methylester

Die Darstellung erfolgte wie bei Methyl-ursolsäure. Der Methylester kristallisierte aus 96%igem Äthanol, nach Zugabe von Wasser bis zur gerade beginnenden Trübung, in Form langer, feiner Nadeln aus. Schmp. nach Trocknung bei 105°: 200°.



Acetyl-oleanolsäure-methylester

Die Darstellung entsprach derjenigen der analogen Ursolsäureverbindung. Das Umkristallisieren erfolgte aus siedendem 96%igem Äthanol und ergab nach dem Trocknen bei 105° Nadeln vom Schmp. 218—219°.



Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sprechen wir für die Unterstützung der Arbeit unseren aufrichtigen Dank aus.

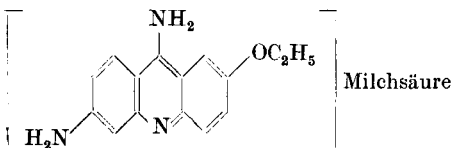
1217. Fr. Rolf Preuß

Zur Stabilisierung von Rivanollösungen gegen Elektrolyte, insbesondere Natriumchlorid und über eine einfache Reaktion zur Unterscheidung von Rivanol- und Trypaflavinlösungen.

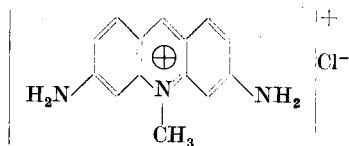
Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Freiburg/Br.,
Direktor Prof. Dr. Dr. Merz.

(Eingegangen am 13. Dezember 1952)

Rivanol und Trypaflavin sind bekanntlich Farbstoffe der Acridinreihe und von untenstehender Konstitution. Sie haben als Oberflächen- und Tiefen-Antiseptica auch neben den Sulfonamiden und Antibiotica immer noch große praktische Bedeutung, das Rivanol auch als peroral anwendbares Mittel gegen infektiöse Darm-erkrankungen verschiedener Ätiologie.



Rivanol (= 2-Äthoxy-6,9-Diamino-acridinlactat).



Trypaflavin (= 3,6-Diamino-10-methyl-acridiniumchlorid).