

DIE CUCURBITACINE VON *CITRULLUS LANATUS* VAR. *CITROIDES*

H. RIPPERGER* und K. SEIFERT

Institut für Biochemie der Pflanzen des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Akademie der Wissenschaften der DDR, Halle (Saale)

(Received in Germany 23 September 1974; Received in the UK for publication 20 January 1975)

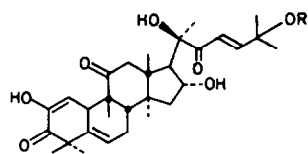
Zusammenfassung—Mit Hilfe von Sephadex-LH-20- bzw. Kieselgel-Chromatographie wurden aus Früchten von *Citrullus lanatus* var. *citroides* (Synonym *C. colocynthoides*) neben Cucurbitacin E (2) zwei Glykoside isoliert, denen die Strukturen 2- α -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin I (3) und 2- α -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E (4) zukommen. 3 ist das dritte Cucurbitacin-Glykosid, das kristallin erhalten wurde.

Abstract—In addition to cucurbitacin E (2) two glycosides were isolated from fruit of *Citrullus lanatus* var. *citroides* (synonym *C. colocynthoides*) by means of sephadex LH-20 or silica gel chromatography. The glycosides possess the structures 2- α -D-glucopyranosyl-cucurbitacin I (3) and 2- α -D-glucopyranosyl-cucurbitacin E (4). 3 is the third cucurbitacin glycoside which was obtained in a crystalline form.

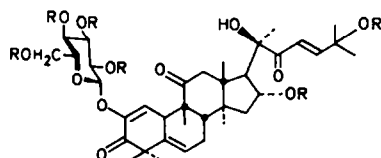
Aus den Früchten der Wassermelone (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf., Synonym *C. vulgaris* Schrad.) wurde von Enslin und Mitarbeitern¹ Elaterinid, ein Glucosyl-cucurbitacin E, isoliert. Vom gleichen südafrikanischen Arbeitskreis² wurden in den Blättern dieser Pflanze die Cucurbitacine I (1) und E (2) papierchromatographisch nachgewiesen. Im folgenden berichten wir über die Isolierung von Cucurbitacin E (2),^{3,4} 2- α -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin I (3) und 2- α -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E (4) aus *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. var. *citroides* (Bailey) Mansf. (Synonym *C. colocynthoides* Pang.). Bei der Trennung dieser Verbindungen wurde die Verteilungschromatographie an Sephadex LH-20⁵ erfolgreich eingesetzt. Adsorptionschromatographie an Kieselgel ist ebenfalls gut geeignet. 2- α -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin I (3) wurde kristallin erhalten und ist somit das dritte kristalline Cucurbitacin-Glykosid.⁶

Die Struktur der beiden Glykoside ergab sich aus ihren spektroskopischen Eigenschaften und chemischen Umsetzungen. In den Infrarotspektren von 3 und 4 (KBr) sind die Enongruppierungen zu erkennen (1690 und 1632 cm^{-1}); bei 4 sind zusätzlich Absorptionsbanden für die Acetylgruppe vorhanden (1723 und 1262 cm^{-1}). Im Elektronenstoss-Massenspektrum von 3 konnte erwartungsgemäß⁷ ein Molekularpeak nicht gefunden werden; das Spektrum besitzt charakteristische Fragmente bei m/e = 658 (Dehydratisierungsprodukt), 514 (Aglykon) und 496 (dehydratisiertes Aglykon).

Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin bei Raumtemperatur lieferte sowohl aus Verbindung 3 als auch 4 die Hexaacetyl-Verbindung 5. Eine Infrarotbande (Nujol) bei 3445 cm^{-1} ist auf die freie 20-Hydroxy-Gruppe zurückzuführen. Im NMR-Spektrum sind die olefinischen Protonen an C-1 als Dublett bei δ = 6.16 ppm (J = 2 Hz), an C-6 als Multipllett bei δ = 5.78 ppm, an C-23 und C-24 als AB-System bei 6.42 und 7.16 ppm (J = 16 Hz) zu erkennen. Die CH_2OAc - und CHOAc -Protonen absorbieren bei 4.28 bzw. 5.13 ppm. Das Signal des Protons am C-1 der Glucose befindet sich bei δ = 3.77 ppm (Dublett, J = 9 Hz). Die O-Acetyl-Gruppen absorbieren zwischen



1: R = H
2: R = Ac



3 R = R' = H
4 R = H, R' = Ac
5 R = R' = Ac

1.88 und 2.10 ppm, die Methylgruppen zwischen 1.04 und 1.60 ppm (vgl. experiment. Teil).⁸

Durch Einwirkung von Esterase aus Kartoffelknollen⁹ wurde das Glykosid 4 in 3 übergeführt. Durch enzymatische Spaltung des Glykosids 4 mit Cellulase erhielt man Cucurbitacin E (2), wodurch sich die Stellung der Acetylgruppe von 4 an o(25) beweisen liess. Bei der Umsetzung mit Schneckenenzym entstand aus 3 bzw. 4 Cucurbitacin I (1). Mineralsaure Hydrolyse von 2- α -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E (4) ergab D-Glucose, Solvolyse von Permethyl-2- α -D-glucopyranosyl-cucurbitacin E 2,3,4,6-Tetra- α -methyl-D-glucose, die als N-[2,3,4,6-Tetra- α -methyl-D-glucopyranosyl]-anilin identifiziert wurde.

Während Cucurbitacin E (2) mit äthanolischer Eisen(III)-chlorid-Lösung¹⁰ auf Dünnschichtplatten als brauner Fleck nachweisbar war, reagierten die Glykoside 3 und 4 nicht mit diesem Reagens. Hieraus ergab sich die Bindung des Zuckers über die enolische Hydroxygruppe an C-2.⁴ Weiterhin fehlt in den Infrarotspektren der Glykoside die für Diosphenole typische Bande bei 1660 cm^{-1} .¹¹ Die durch die Formelbilder 3 und 4 kenn-

*Zur Zuordnung der Signale vgl. Lit.^{7,8}

zeichnete β -Konfiguration des glykosidischen Kohlenstoffatoms wurde auf Grund der Klyneschen Regel¹² abgeleitet: molare Drehungsverschiebung für 1→3 -193° (Äthanol), für 2→4 -110° (Chloroform).^{*} In Einklang mit dieser Konfiguration und der Pyranosid-Struktur steht die leichte Spaltbarkeit durch Cellulase. Auch das ¹H-NMR-Spektrum der Hexaacetyl-Verbindung 5 weist auf β -Konfiguration hin (vgl. experiment. Teil).

Nach den physikalischen Konstanten und Spaltprodukten dürfte 2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E (4) identisch sein mit dem von Enslin und Mitarbeitern¹ isolierten linksdrehenden Elaterinid. Aus Früchten von *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. wurden rechtsdrehende Glucoside von Cucurbitacin I¹⁴ und E¹⁴ isoliert. Die Klärung der strukturellen Unterschiede zwischen diesen und unseren Präparaten muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

EXPERIMENTELLER TEIL

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach Böettius bestimmt und sind korrigiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die spezifischen Drehungen in Chloroform gemessen. Die IR-Spektren wurden mit einem Zeiss-Zweistrahl-Spektrophotometer UR 10, das NMR-Spektrum wurde mit einem 100-MHz-Gerät der Fa. Varian Associates unter Verwendung von TMS als internem Standard und das Massenspektrum mit einem Massenspektrographen des Forschungsinstituts Manfred von Ardenne, Dresden, bei der Verdampfungstemperatur von 110°C aufgenommen. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte an Kieselgel GF₂₅₄ (Merck), die Säulenchromatographie an Kieselgel (Merck, 0.05–0.2 mm). Die Substanzen wurden auf Grund der Fluoreszenzlösung und zusätzlich durch eine 1-proz. Lösung von Vanillin in 50-proz. Phosphorsäure bei 120°C nachgewiesen. Zur Elementaranalyse wurde bei 100°C i. Hochvak. getrocknet.

Extraktion von Pflanzenmaterial

Im Herbst geerntete Früchte wurden im April des nächsten Jahres in kleine Stücke zerschnitten, in einer Mixette zerkleinert und dreimal mit Methanol extrahiert. Nach Abdestillieren des Methanols i. Vak. wurde die verbleibende wässr. Lösung (etwa 0.5 l) dreimal mit Chloroform/Äthanol (2:1) extrahiert. Einengen des Extrakts i. Vak. ergab einen amorphen, bitter schmeckenden Rückstand (0.13%). DC [Chloroform/Methanol (4:1)]: $R_F = 0.77$ (Cucurbitacin E, 2), 0.53 (2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E, 4) und 0.44 (2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin I, 3).

Chromatographie an Sephadex LH-20

50 g Sephadex LH-20 wurden mit der wässr. Phase des Gemisches Essigester/Wasser/Äthanol (95:95:10) über Nacht gequollen, in ein Säulenrohr (Durchmesser 2 cm) gefüllt und mit der organischen Phase gewaschen. 3.5 g Rohsubstanz wurden in 5 ml der organischen Phase gelöst und auf die Säule gebracht. Eluiert wurde mit der organischen Phase. Die Fraktionen (zu 50 ml) 2–6 enthielten ein Gemisch von 2 und 4, die Fraktionen 8–12 3. Zur Trennung von 2 und 4 wurde eine Säule gleicher Größe mit dem Lösungsmittelsystem Essigester/Wasser/Benzin/Methanol (40:25:20:10), ab Fraktion 16 Essigester/Wasser/Benzin/Methanol (45:35:10:7.5) verwendet. Die Fraktionen (zu 50 ml) 2–4 enthielten 2, 12–19 4.

Chromatographie an Kieselgel

10 g Rohsubstanz wurden an 200 g Kieselgel chromatographiert. Die Fraktionen (zu 100 ml) 1–10 wurden mit Chloroform, 11–16 mit Chloroform/Methanol (19:1) und 17–31 mit Chloroform/Methanol (9:1) eluiert. Die Fraktionen 15–16 enthielten 2, 21–24 4 und 26–27 3.

*Bezüglich der Drehwerte von α - und β -Methylglucosid vgl. Lit.¹³, bezüglich des Drehwertes von Cucurbitacin I in Äthanol vgl. Lit.¹⁰

Cucurbitacin E (2). Aus Methanol Kristalle (0.002%, bezogen auf Pflanzenfrischgewicht) vom Schmp. 237–238°C und $[\alpha]_D^{25} = -62.0^\circ$ (c = 0.54) [Lit.³: Schmp. 232–233°C und $[\alpha]_D = -59^\circ$, Lit.⁴: Schmp. 236–238°C], nach DC [Chloroform/Methanol (19:1), $R_F = 0.48$] und IR-Spektrum (KBr) mit authent. Cucurbitacin E identisch.

2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E (4). Die Reinigung erfolgte durch Äther-Extraktion im Soxhlet entsprechend Lit.¹³; farbloses Pulver (0.02%, bezogen auf Pflanzenfrischgewicht) vom Schmp. 148–150°C und $[\alpha]_D^{25} = -63.5^\circ$ (c = 0.80), $[\alpha]_D^{25} = -52.9^\circ$ (c = 0.58 in Äthanol) [Lit.¹: $[\alpha]_D = -70^\circ$ (Chloroform)]. IR-Spektrum (KBr): 1723 (OAc), 1690 (3-, 11- und 22-Keton), 1632 (Δ^1 und Δ^2), 1262 cm⁻¹ (OAc).

2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin I (3). Aus Essigester/Methanol unter Zusatz einer Spur Wasser Nadeln (0.001%, bezogen auf Pflanzenfrischgewicht) vom Schmp. 241–243°C (Zers., Sintern ab 188°C) und $[\alpha]_D^{25} = -72.6^\circ$ (c = 0.90 in Äthanol). IR-Spektrum (KBr): 1690 (3-, 11- und 22-Keton), 1632 cm⁻¹ (Δ^1 und Δ^2); Elektronenstoss-Massenspektrum: $m/e = 658$ (M-H₂O), 514 (Aglykon), 496 (Aglykon -H₂O). (C₃₀H₄₂O₁₂ (676.8) Ber. C, 63.89; H, 7.75; Gef. C, 63.28; H, 7.61%).

16,25,2',3',4',6'-Hexa-o-acetyl-2-o- β -D-glucopyranosyl-cucurbitacin I (5). 3 wurde 10 Tage, 4 wurde 4 Tage in Pyridin/Acetanhydrid (1:1) bei Raumtemp. acetyliert. Man chromatographierte an Kieselgel. Nach Waschen mit Chloroform wurde 5 durch Chloroform/Essigester (19:1) eluiert: Ausbeute 35 bzw. 83%, amorph, $[\alpha]_D^{25} = -64.6^\circ$ (c = 0.88). IR-Spektrum (Nujol): 3445 (OH), 1740 (OAc), 1692 (3-, 11- und 22-Keton), 1632 (Δ^1 und Δ^2), 1220 cm⁻¹ (OAc); NMR-Spektrum (CDCl₃): $\delta = 1.04$ (6H, s, CH₃), 1.22 (3H, s, CH₃), 1.29 (3H, s, CH₃), 1.35 (3H, s, CH₃), 1.43 (3H, s, 21-H₃), 1.60 (6H, s, 26-H₃, 27-H₃), 1.88 (3H, s, OAc), 2.02 (3H, s, OAc), 2.04 (6H, s, OAc), 2.08 (3H, s, OAc), 2.10 (3H, s, OAc), 3.77 (1H, d, J = 9 Hz, 1'-H), 4.28 (2H, d, J = 3 Hz, CH₂OAc), 5.13 (4H, t, J = 8 Hz, CHOAc), 5.78 (1H, m, 6-H), 6.16 (1H, d, J = 2 Hz, 1-H), 6.42 (1H, d, J = 16 Hz, 23-H), 7.16 ppm (1H, d, J = 16 Hz, 24-H).

Überführung von 2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E (4) in 2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin I (3). 100 ml Kartoffelsaft¹ blieben nach Zugabe von 100 mg 4 in 3–3 ml Äthanol 5 h bei 30°C stehen. Man extrahierte dreimal mit CHCl₃/EtOH und engte den Auszug i. Vak. ein. Durch Chromatographie an Sephadex LH-20 unter Verwendung von Essigester/Wasser/Äthanol (95:95:10) wurde 3 isoliert; aus Essigester/Methanol unter Zusatz einer Spur Wasser 56 mg (59%) Nadeln vom Schmp. 232–239°C (Zers., Sintern ab 188°C); nach DC, $[\alpha]_D$ und IR-Spektrum (KBr) mit authent. 3 identisch.

Glykosidspaltung bei 2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E (4) durch Cellulase. 68 mg 4 wurden in 0.8 ml Methanol gelöst und mit 10 ml Wasser versetzt. Die Lösung engte man i. Vak. ein, bis 4 anfing, sich wieder abzuscheiden. Man setzte 10 ml Acetatlösung vom pH 5 (7 ml N NaOH, 10 ml N CH₃CO₂H) und 50 mg Cellulase pract. (aus *Aspergillus niger*, Serva Feinbiochemica Heidelberg) zu. Nach 1 Tag Stehen bei 40°C wurde der Niederschlag aus Methanol umkristallisiert: 24 mg 2 (46%); nach Schmp., $[\alpha]_D$, DC und IR-Spektrum (KBr) identisch mit authent. 2.

Hydrolyse von 2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin I (3) bzw. E (4) durch Helicase. Jeweils 0.5 mg 3 bzw. 4 wurden mit 0.015 ml Äthanol, 0.2 ml Phosphatpuffer (pH 7) und 0.05 ml Helicase-Präparat (aus dem Verdauungsstrakt von *Helix pomatia*) versetzt. Nach 3 h bei 35°C waren bei beiden Ansätzen Cucurbitacin I (1) und 2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin I (3) im Verhältnis von etwa 1:2 dünnsschichtchromatographisch nachweisbar; nach 24 h war lediglich noch 1 vorhanden.

Mineralsaure Hydrolyse von 2-o- β -D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E (4). Eine Lösung von 13 mg 4 in 1.5 ml 2N H₂SO₄ und 1.5 ml Äthanol wurde 1.5 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde i. Vak. auf etwa 1.5 ml abdestilliert und mit 1.5 ml Wasser versetzt. Nach Zusatz von BaCO₃ wurde filtriert und das Filtrat bei 50°C Badtemp. i. Vak. eingedunstet. Durch DC an Kieselgel G (n-Propanol/Essigester/Wasser (7:2:1)) und Detektion mit Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure-Reagens bei 85°C konnte Glucose nachgewiesen werden.

2,3,4,6-Tetra-o-methyl-D-glucose. Eine Lösung von 700 mg 4

und 3.5 ml Methyljodid in 10 ml Dimethylformamid wurde 17 h mit 1.8 g Silberoxid geschüttelt. Das Silberoxid wurde abzentrifugiert und dreimal mit Dimethylformamid gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden mit 30 ml 3 proz. wässr. Kaliumcyanid-Lösung versetzt und 5 mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroform-Auszüge wusch man 6 mal mit Wasser und trocknete über Na_2SO_4 . Nach Abdestillieren des Lösungsmittels *i. Vak.*, zuletzt bei 80°C Badtemp., wurden 780 mg Permethyl-Produkt erhalten.

Die Lösung von 780 mg Permethyl-Verbindung und 250 mg Chlorwasserstoff in 5 ml absol. Methanol wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt, dann mit 20 ml Wasser versetzt und *i. Vak.* auf etwa 20 ml eingengt. Nach Abfiltrieren des Aglykons wurde mit 10 ml 28 proz. Salzsäure versetzt, 3 h bei 95–100°C gehalten und durch eine Säule aus 30 g Dowex 3 filtriert. Das Filtrat engte man *i. Vak.* ein und chromatographierte den Rückstand an 11 g Kieselgel. Die Fraktionen (zu 5 ml) 1–3 wurden mit Benzol, 4–7 mit Benzol/Aceton (9:1), 8–11 mit Benzol/Aceton (4:1), 12–19 mit Benzol/Aceton (7:3) und 20–27 mit Benzol/Aceton (1:1) eluiert. Die Fraktionen 19–24 [$R_F = 0.43$ bei DC mit Benzol/Aceton (2:1)] lieferten 28 mg (12%) 2,3,4,6-Tetra-o-methyl-D-glucose.

N - [2,3,4,6 - Tetra - o - methyl - D - glucopyranosyl] - anilin. Die Lösung von 28 mg 2,3,4,6 - Tetra - o - methyl - D - glucose und 58 mg Anilin in 1 ml absol. Äthanol wurde 3 h zum Sieden erhitzt. Lösungsmittel und Anilin wurden *i. Vak.* bei 60°C abdestilliert; aus absol. Äthanol lange Nadeln vom Schmp. 133–135°C und $[\alpha]_D^{20} = +215.0^\circ$ ($c = 0.72$ in Aceton) [Lit.¹⁶: Schmp. 135°C, $[\alpha]_D = +229.5^\circ$ (Aceton)]; nach dem IR-Spektrum (KBr) identisch mit authent. N - [2,3,4,6 - Tetra - o - methyl - D - glucopyranosyl] - anilin.¹⁶

Danksagung—Herrn Diplomingenieur I. Grebenščikov, Gatersleben, DDR, danken wir für das Pflanzenmaterial, Herrn Professor

Dr. D. Lavie, Rehovoth, Israel, für Cucurbitacin I und Herrn Dr. J. R. Bull, Pretoria, Südafrika, für Cucurbitacin E.

LITERATUR

- ¹P. R. Enslin, F. J. Joubert und S. Rehm, *J. Science Food Agriculture* **7**, 646 (1956).
- ²S. Rehm, P. R. Enslin, A. D. J. Meeuse und J. H. Wessels, *Ibid.* **8**, 679 (1957).
- ³D. Lavie und E. Glotter, in *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Bd. XXIX, S. 307, Springer-Verlag, Wien, New York (1971).
- ⁴H. El Khadem und M. M. A. Abdel Rahman, *J. Chem. Soc.* 4991 (1963).
- ⁵J. MacMillan und C. M. Wels, *J. Chromatography* **87**, 271 (1973).
- ⁶Vgl. P. Tunmann und H. Wienecke, *Arch. Pharm.* **293**, 195 (1960); S. M. Kupchan, C. W. Sigel, L. J. Guttman, R. J. Restivo und R. F. Bryan, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 1353 (1972).
- ⁷P. J. Curtis und P. M. Meade, *Phytochemistry* **10**, 3081 (1971).
- ⁸S. M. Kupchan, G. Tsou und C. W. Sigel, *J. Org. Chem.* **38**, 1420 (1973).
- ⁹H. M. Schwartz, S. I. Biedron, M. M. von Holdt und S. Rehm, *Phytochemistry* **3**, 189 (1964).
- ¹⁰R. Gmelin, *Arzneimittelforschung* **13**, 771 (1963).
- ¹¹P. R. Enslin, S. Rehm und D. E. A. Rivett, *J. Science Food Agriculture* **8**, 673 (1957).
- ¹²W. Klyne, *Biochem. J.* **47**, XLI (1950).
- ¹³F. Micheel, *Chemie der Zucker und Polysaccharide*, 2. Aufl., Akademische Verlagsgesellschaft Geest und Portig, Leipzig (1956).
- ¹⁴H. Auerhoff und R. Müller, *Deutsche Apotheker-Zeitung* **39**, 1353 (1967).
- ¹⁵D. Lavie, D. Willner und Z. Merenlender, *Phytochemistry* **3**, 51 (1964).
- ¹⁶J. C. Irvine und A. M. Modie, *J. Chem. Soc.* **93**, 95 (1908).