

Massenspektren von Triterpensaponin-permethylyat des Oleanantyps

RYUICHI HIGUCHI, TETSUYA KOMORI, und TOSHIO KAWASAKI

Fakultät für Pharmazeutische Wissenschaften der Universität Kyushu¹⁾

(Eingegangen am 31, Januar 1976)

Die aus der Früchte der *Akebia quinata* DECNE erhaltenen Oleanolsäure- und Hederagenin-3-O-Glykoside bzw. 3,28-O-bis-Glykoside sowie Arjunolsäure- und Norarjunolsäure-28-O-Glykoside wurden als Methylyat massenspektrometrisch vergleichend untersucht, um einfache Unterscheidungsmethode dieser drei Glykosid-type zu finden.

Bisher wurden die massenspektrometrische Untersuchungen über die Steroid- und Triterpenoid-Glykoside von einigen Seiten intensiv bearbeitet: Herzaktive Glykoside,²⁾ Dammarantyp Triterpensaponine³⁾ und Steroidsaponine.⁴⁾ Kochetkov und Mitarbeiter⁵⁾ hatten besonders den Nachdruck auf die Frangmentierungsmechanismus des Oleanolsäure 3-O-Glykosids gelegt.

Aus der Früchte der *Akebia quinata* DECNE sind nun 17 Oleanantyp Triterpensaponine^{6,7)} isoliert und die Strukturen aufgeklärt worden. Diese Saponine haben die strukturelle Eigentümlichkeit, weil die Arabinopyranose in 3-Stellung und/oder die Glucopyranose in 28-Stellung des Aglykonteils direkt glykosidisch verbunden sind.

Um die hochauflösenden Massenspektren in Bezug auf die Unterscheidung zwischen diesen drei 3-O-, 28-O- und 3,28-O-bis-Glykosid-typ anzuwenden, liessen sich die in Tabelle 1 angegebene Glykosidpermethylate und die vier Vergleichssubstanzen systematisch unmittelbar analysieren und konnten einige interessanten Resultaten erhalten werden.

Experimentelles

Isolierung und Reinigung der freien Glykoside und ihre Derivatisieren wurden früher berichtet.^{6,7)} Permethylyate wurden nach Kuhn⁸⁾-oder Hakomori⁹⁾-methode erhalten.

Die Massenspektrometer wurden mit dem doppelfokussierenden Massenspektrometer JEOL-JMS-01SG (Mattauch-Herzogtyp) mit Direkteinlass-system aufgenommen. Die geeigneten Bedingungen zur Aufnahme der Spektren waren: Ionisierungsstrom 200 μ A; Beschleunigung 4.5—4.8 kV; Ionisierungsenergie 30 eV. Die Beschleunigung und Probetemperaturen im Fall der Vergleichssubstanzen waren: Methyloleanolat, 6.7 kV, 180°; 23-O-Methyl Hederageninmethylester, 4.7 kV, 178°; Arjunolsäure Permethylyat; 4.7 kV, 129°; Norarjunolsäure Permethylyat; 4.7 kV, 132°. Bei der photographischen Aufzeichnung wurde Perfluorkerosen als innerer Standard benutzt; Belichtung 10⁻⁹ Coulomb; Ionisierungsenergie 75 eV.

1) Lokalität: *Maedashi 3-1-1, Higashi-ku, 812, Fukuoka.*2) a) P. Brown, F. Brüscheiler, G.R. Pettit, und T. Reichstein, *Org. Mass Spectrom.*, **5**, 573 (1971); b) F.C. Falkner, J. Frölich, und J.T. Watson, *ibid.*, **7**, 141 (1973); c) P. Brown, F. Brüscheiler, und G.R. Pettit, *Helv. Chim. Acta*, **55**, 531 (1972).3) T. Komori, O. Tanaka, und Y. Nagai, *Org. Mass Spectrom.*, **9**, 744 (1974).4) T. Komori, Y. Ida, Y. Mutoh, K. Miyahara, T. Nohara, und T. Kawasaki, *Biomed. Mass Spectrom.*, **2**, 65 (1975).5) A.F. Sviridov, L.P. Vecherko, V.I. Kadentsev, O.S. Chizov, und N.K. Kochetkov, *Bull. Acad. Sci. USSR*, **22**, 2647 (1973); *idem.*, *ibid.*, **23**, 105 (1974).6) R. Higuchi, K. Miyahara, und T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **20**, 1935 (1972).7) R. Higuchi und T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **20**, 2143 (1972); *idem.*, *ibid.*, **24**, 1021, 1314 (1976).8) R. Kuhn, I. Löw, und H. Trischmann, *Chem. Ber.*, **88**, 1492 (1955).9) S. Hakomori, *J. Biochem.* (Tokyo), **55**, 205 (1964).

TABLE I. Untersuchte Oleanantyp Triterpen Glykoside

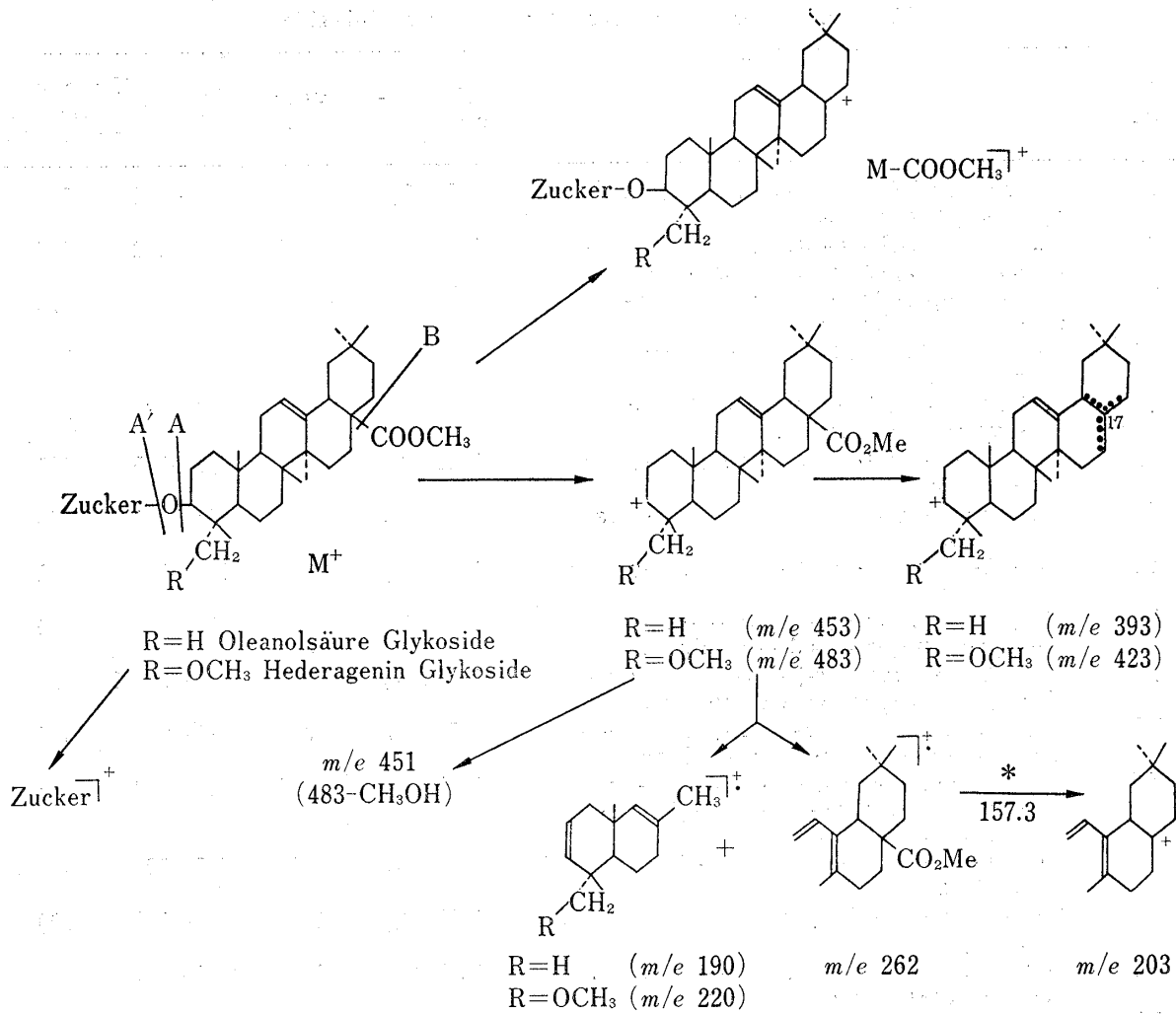
Verbindung Nr.	Name	Molekularformel	Molekulargewicht	Schmp. (°C)	Temp. in Ionisierungskassette (°C)
I	Oleanolsäure(Ol. sre)3-O- α -L-arabino(ara)-pyranosid Permethylat	C ₃₉ H ₆₄ O ₇	644	180—182	140
II	Ol. sre 3-O- α -L-rhamn(rha)pyranosyl(pyr)-(1→2)- α -L-ara pyranosid Permethylat	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₁	818	210—212	186
III	Ol. sre 4-O- β -D-gluco(glc)pyr-(1→2)- α -L-ara·pyranosid Permethylat	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₂	848	144—146	170
IV	Hederagenin(Hedg.)3-O- α -L-ara·pyranosid Permethylat	C ₄₀ H ₆₆ O ₈	674	181—182	145
V	Hedg. 3-O- β -D-xylo(xyl)pyr-(1→2)- α -L-ara·pyranosid Permethylat	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₂	834	187—188	220
VI	Hedg. 3-O- β -D-xyl·pyr-(1→3)- α -L-ara·pyranosid Permethylat	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₂	834	112—115	161
VII	Hedg. 3-O- β -D-glc·pyr-(1→2)- α -L-ara·pyranosid Permethylat	C ₄₉ H ₈₂ O ₁₃	878	104—105	160
VIII	Hedg. 3-O- α -L-rha·pyr-(1→2)- α -L-ara·pyranosid Permethylat	C ₄₆ H ₈₀ O ₁₂	848	110—112	162
IX	Hedg. 3-O- β -D-xyl·pyr-(1→3)- α -L-rha·pyr-(1→2)- α -L-ara·pyranosid Permethylat	C ₅₅ H ₉₂ O ₁₆	1008	118—120	190
X	Hedg. 3-O- α -L-rha·pyr-(1→4)-[β -D-glc·pyr-(1→2)]- α -L-ara·pyranosid Permethylat	C ₅₇ H ₉₆ O ₁₇	1052	211—211.5	210
XI	Norarjunolsäure 28-O- α -L-rha·pyr-(1→4)- β -D-glc·pyr-(1→6)- β -D-glc·pyranosid Permethylat	C ₅₉ H ₉₈ O ₁₉	1010	95—98	172
XII	Arjunolsäure 28-O- β -D-xyl·pyr-(1→3)- α -L-rha·pyr-(1→4)- β -D-glc·pyr-(1→6)- β -D-glc·pyranosid Permethylat	C ₆₇ H ₁₁₄ O ₂₃	1286	110—113	208
XIII	3-O- α -L-Ara·pyr-Hedg. 28-O- β -D-glc·pyranosid Permethylat	C ₄₉ H ₈₂ O ₁₃	878	115—120	180
XIV	3-O- α -L-Ara·pyr-Hedg. 28-O- β -D-gentiobiosid Permethylat	C ₅₈ H ₉₈ O ₁₈	1082	109—110	200
XV	3-O- β -D-Xyl·pyr-(1→2)- α -L-ara·pyr-Hedg. 28-O- β -D-glc·pyranosid Permethylat	C ₅₆ H ₉₄ O ₁₇	1038	115—117	230
XVI	3-O- β -D-Xyl·pyr-(1→2)- α -L-ara·pyr-Hedg. 28-O- β -gentiobiosid Permethylat	C ₆₅ H ₁₁₀ O ₂₂	1242	112—113	213
XVII	3-O- β -D-Glc·pyr-(1→2)- α -L-ara·pyr-Hedg. 28-O- β -gentiobiosid Permethylat	C ₆₇ H ₁₁₄ O ₂₃	1286	110—112	223
XVIII	3-O- α -L-Ara·pyr-Hedg. 28-O- α -L-rha·pyr-(1→4)- β -D-glc·pyr-(1→6)- β -D-glc·pyranosid Permethylat	C ₆₆ H ₁₁₂ O ₂₂	1256	109—111	220
XIX	3-O- α -L-Rha·pyr-(1→2)- α -L-ara·pyr-Hedg. 28-O- α -L-rha-(1→4)- β -D-glc·pyr-(1→6)- β -D-glc·pyranosid Permethylat	C ₇₄ H ₁₂₆ O ₂₆	1430	119—122	210
XX	3-O- α -L-Rha·pyr-(1→2)- α -L-ara·pyr-Ol. sre 28-O- α -L-rha·pyr-(1→4)- β -D-glc·pyr-(1→6)- β -D-glc pyranosid Permethylat	C ₇₃ H ₁₂₄ O ₂₅	1400	108—110	162

Ergebnis und Diskussion

3-O-Glykoside

In allen Spektren werden nun die Molekül (M)- und (M-COOCH₃)-Ionen beobachtet. Das letztere wurde das durch die B-Spaltung herkommende Ion genannt.

Ferner lieferten die Oleanolsäureglykoside I—III die Ionen m/e 453, 393, 262, 203 und 190 mit hohen Intensität. Diese drei Ionen (m/e 262, 203, 190) wurden auch in den Spektren der Vergleichssubstanzen Methyloleanat [charakterische Fragmente; m/e 470 (M), 262, 207, 203, 190] beobachtet, während nur in den Spektren der Glykoside jene Ionen mit m/e 453 (C₃₁H₄₉O₂) und 393 (C₂₉H₄₅) erschienen. Wie schon Kochetkov und Mitarbeiter⁵⁾ berichtet hatten, führt die einfache Spaltung zwischen dem glykosidischen Sauerstoff und C-3 des Aglykons zum Ion m/e 453, das das durch die A-Spaltung herkommende Ion heisst. Das



Schema 1. Fragmentierung von Oleanolsäure- und Hederagenin-3-O-Glykoside Permethyle (*Metastabile Ion)

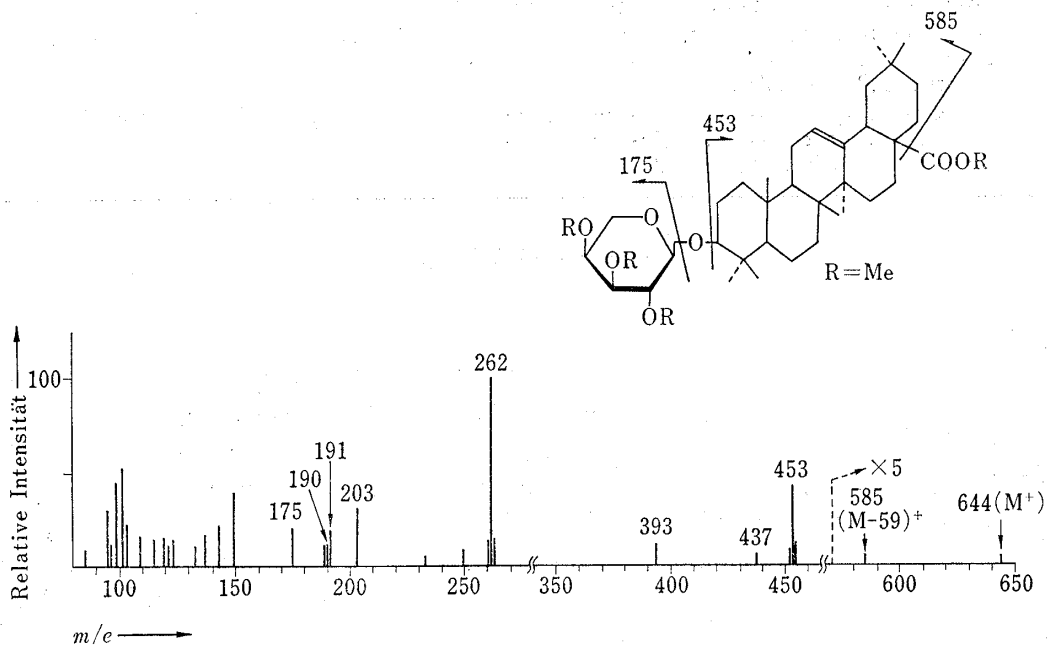


Fig. 1. Massenspektrum von I

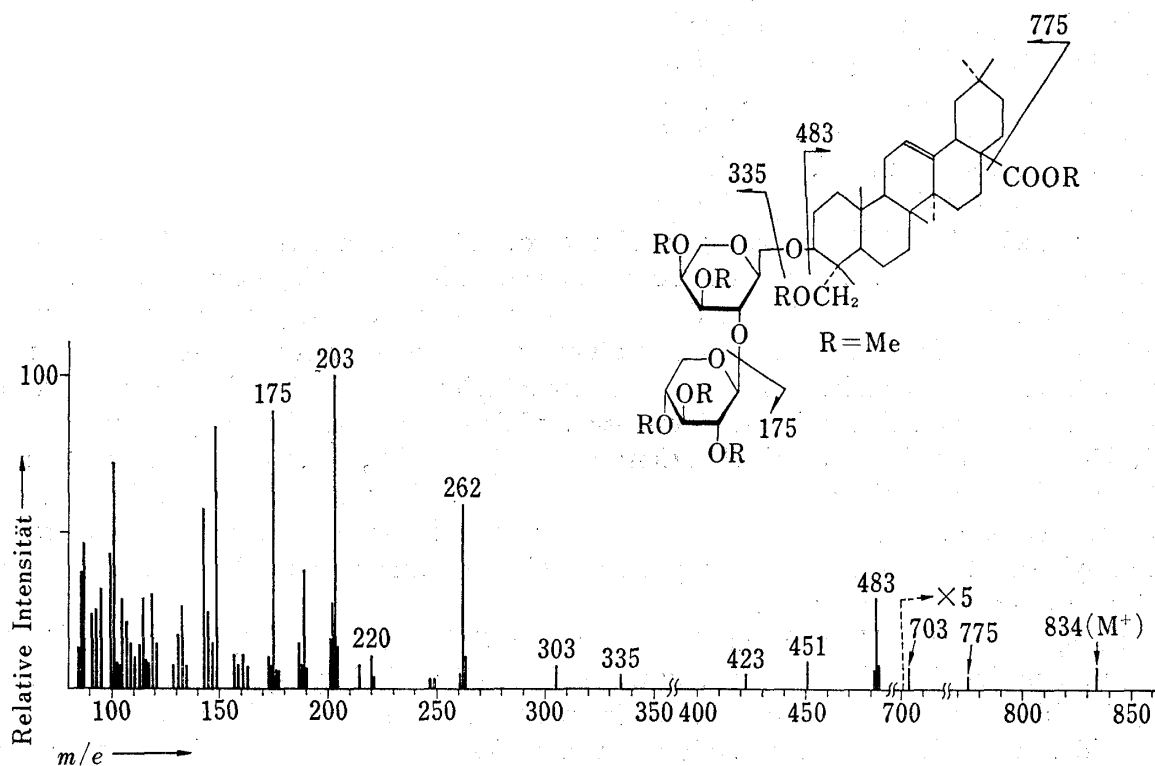


Fig. 2. Massenspektrum von V

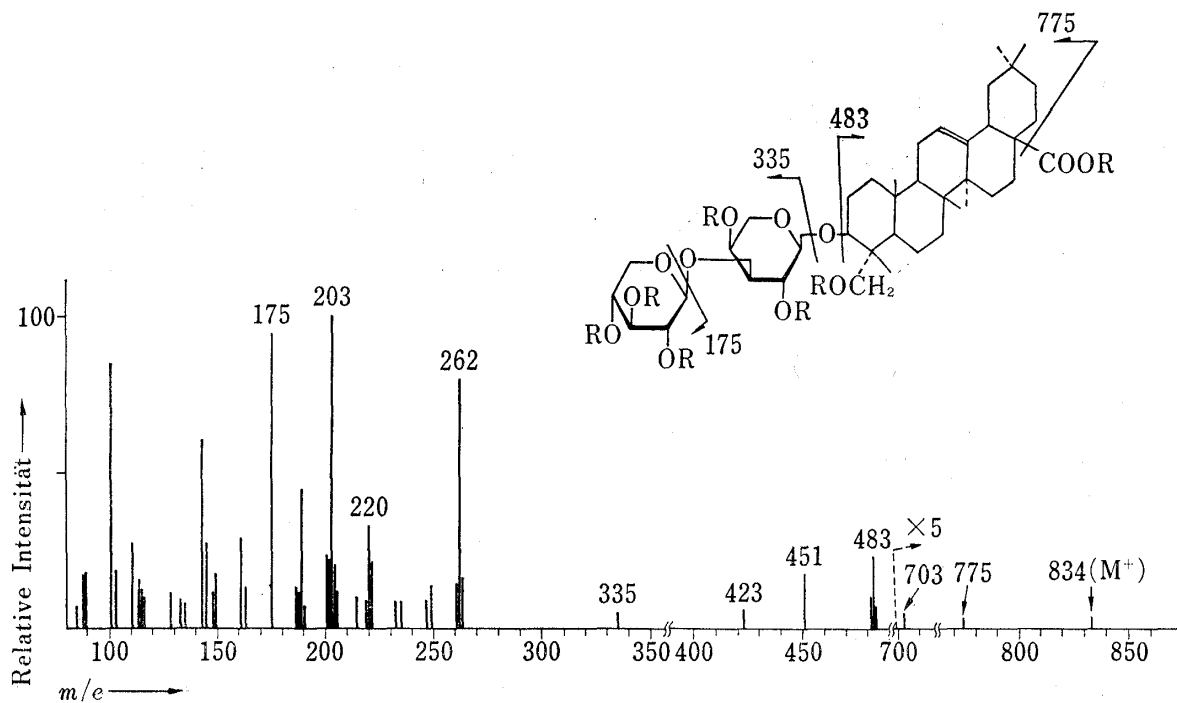


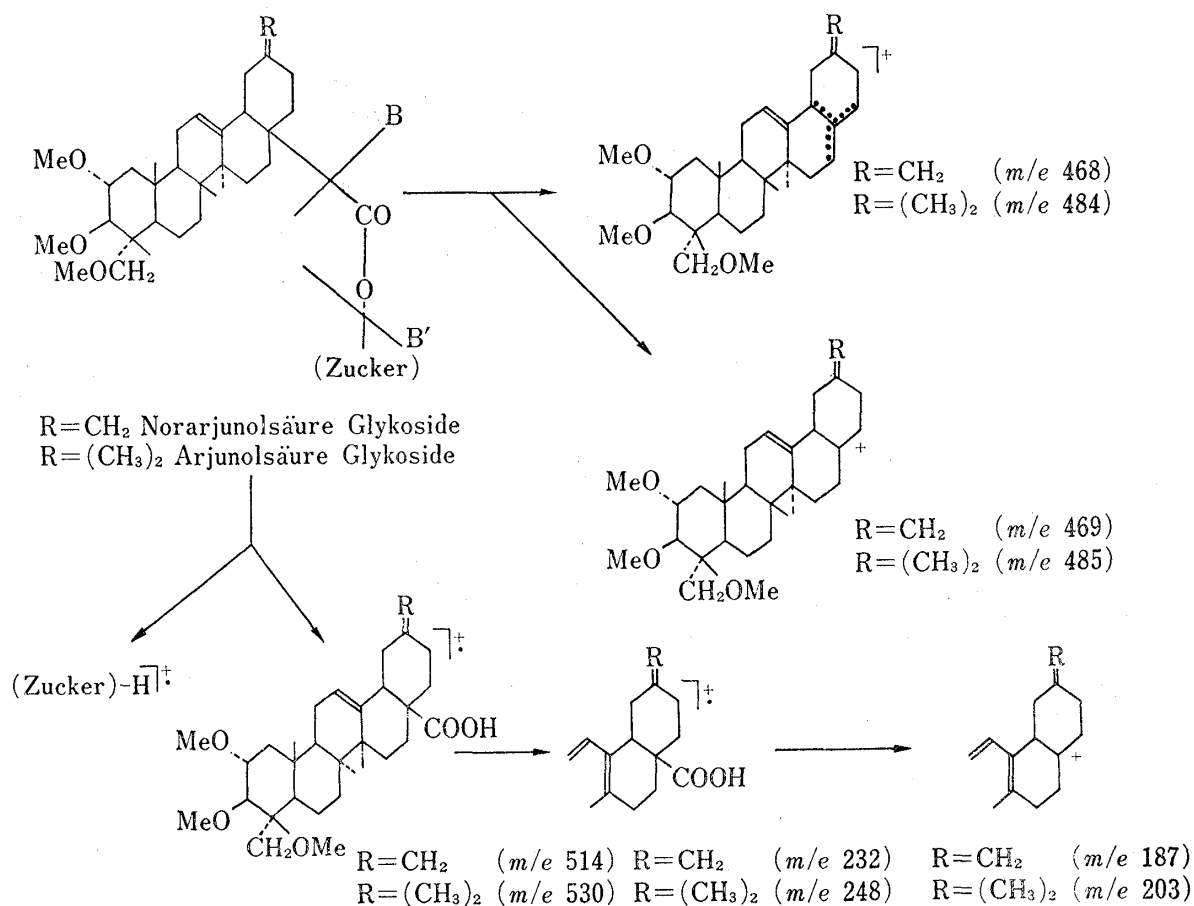
Fig. 3. Massenspektrum von VI

Ion m/e 393 entstand aus dem Ion m/e 453 durch die B-Spaltung und fortgesetzte Wasserstoffeliminierung. Der Retro-Diels-Alder (RDA)-Zerfall unter weitere Wasserstoffeliminierung beim Ion m/e 453 brachten ferner die Ionen mit $190 m/e$ ($C_{14}H_{22}$), 191 ($C_{14}H_{23}$) und 262 ($C_{17}H_{26}O_2$) hervor. Metastabile Ion (m/e 157.3) kennzeichnet die $COOCH_3$ -Abspaltung aus dem Ion m/e 262 zum Ion m/e 203.

In den Spektren der Hederageninglykoside IV—X wurden die Ionen mit m/e 483 ($C_{32}H_{51}O_3$), 451 ($C_{31}H_{47}O_2$), 423 ($C_{30}H_{47}O$), 262 ($C_{17}H_{26}O_2$), 220 ($C_{15}H_{24}O$) und 203 ($C_{15}H_{23}$) mit grosser Intensität beobachtet. Jene drei Ionen mit m/e 483, 451 und 423 traten im Fall von 23-O-Methyl Hederageninmethylester [charakteristische Fragmente; 500 (M), 262, 237, 220, 203] dagegen kaum auf. In gleicherweise wie bei den Oleanolsäureglykoside kann auch charakteristische A-Spaltung zum Ion m/e 483 hier stattfinden, die sowohl von einer $HCOO-CH_3$ - als auch CH_3OH -Eliminierung gefolgt wird. Man kann ferner annehmen, dass die Ionen mit m/e 220 und 262 durch RDA-Zerfall aus dem Ion m/e 483 gebildet wurden.

Wie früher schon im Fall der Spirostanol- und Furostanol-glykoside⁴⁾ gezeigt wurde, wurde die aus der Spaltung zwischen dem glykosidischen Sauerstoff und C-1 des Zuckerrings entstandenen ungeradzähligen Ionen (Penta-O-methylidisaccharidyl-kation; m/e 335 von V und VI, m/e 349 von II und VIII, Hexa-O-methylidisaccharidyl-kation; m/e 379 von III und VII, Hepta-O-methyltrisaccharidyl-kation; m/e 509 von IX, Octa-O-methyltrisaccharidyl-kation; m/e 553 von X) in allen Spektren beobachtet. Wir nennen sie die durch die A'-Spaltung herkommenden Ionen. Natürlich sind die terminalen Xylopyranosyl- oder Arabinopyranosyl- (m/e 175), Rhamnopyranosyl- (m/e 189) und Glucopyranosyl- (m/e 219) Kationen auch charakteristisch vorhanden.

In Spektren von V erscheint ferner ein Ion $C_{14}H_{23}O_7$ (m/e 303) entsprechend einer Eliminierung des CH_3OH aus dem ungeraden Penta-O-methyl-xylosylarabinosyl-kation m/e 335, obwohl kein solches Ion m/e 303 im Fall von VI beobachtet werden konnte. Die isomeren Glykoside, die sich terminalen Xylose-rest am C-2 oder C-3 des Arabinopyranoserings verbinden, konnten deshalb massenspektrometrisch unterschieden werden.



Schema 2. Fragmentierung von Norarjunolsäure- und Arjunolsäure-28-O-Glykoside Permethyleate

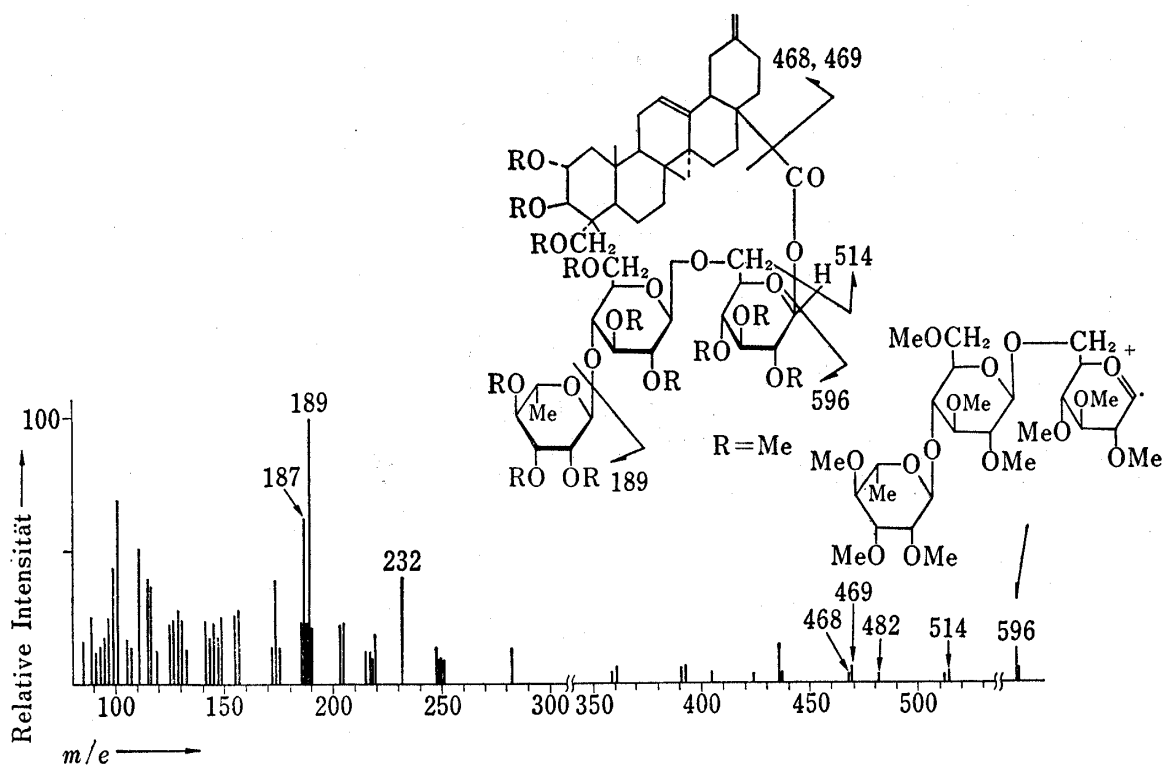


Fig. 4. Massenspektrum von XI

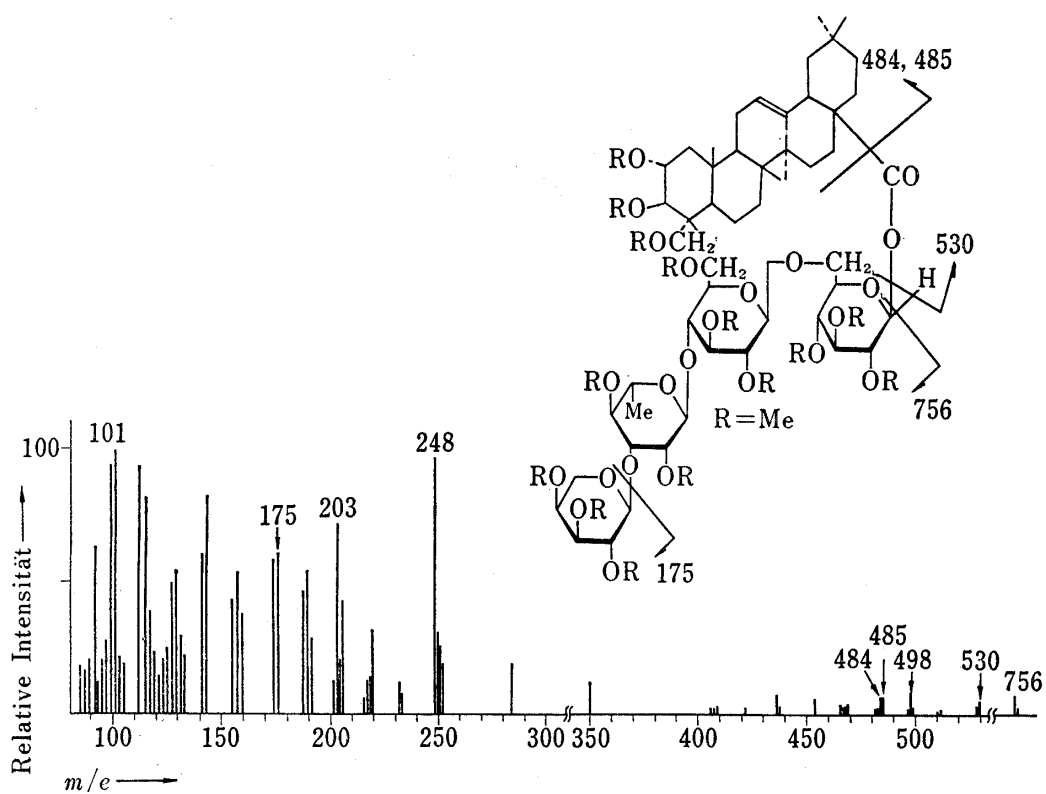
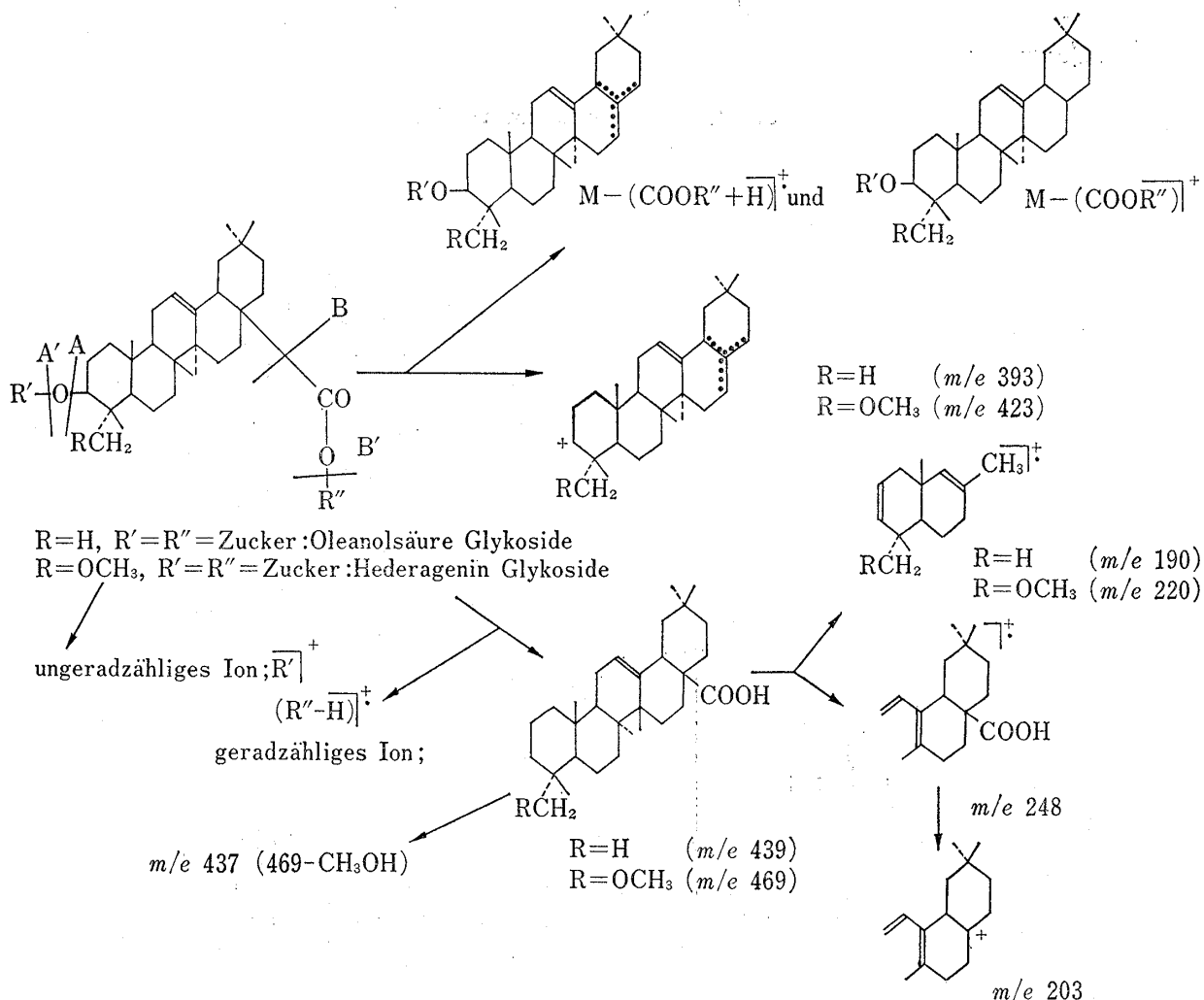


Fig. 5. Massenspektrum von XII

28-O-Glykoside

In den Spektren der 28-O-Glykoside (XI und XII) wurde kein M-Ion beobachtet, wohl aber die intensiven Ionen mit m/e 596, 514, 482, 469, 468, 232 und 187 im Fall von XI und die Ionen mit m/e 756, 530, 498, 485, 484, 248 und 203 im Spektrum von XII werden erkannt. Man soll auf die geradzählige Ionen m/e 596 und 756 (siehe Fig. 4 und 5) achtsam sein, weil sie aus dem Fragment des Oligosaccharid-rests stammen. Sie gingen nämlich aus der Spaltung (B'-Spaltung, siehe Schema 2) der glykosidischen Bindung unter Eliminierung der freien Säure [m/e 514 ($C_{32}H_{50}O_5$) und 530 ($C_{33}H_{54}O_5$)] respektiv hervor. Man kann hierbei annehmen, dass die Massensumme dieses geradzähligen Radikaltyp-Ions und des Fragment-Ions für freie Säure die Massenzahl von M-Ion zeigt.

Abgesehen von den Ionen mit m/e 187 ($C_{14}H_{19}$) und 469 ($C_{31}H_{49}O_3$) beim XI und m/e 203 ($C_{15}H_{23}$) und 485 ($C_{32}H_{53}O_3$) im Fall von XII waren jede vier Peak [m/e 514, 482 ($514 - CH_3OH$), 468 ($C_{31}H_{48}O_3$), 232 ($C_{15}H_{20}O_2$); 530, 498 ($530 - CH_3OH$), 484 ($C_{32}H_{52}O_3$), 248 ($C_{16}H_{24}O_2$)] in den Spektren der freien Säuremethylester [charakteristische Fragmente; Arjunolsäure Permethylyat, m/e 544 (M), 262, 203. Norarjunolsäure Permethylyat, m/e 528 (M), 246, 187.] nicht nachweisbar. Sie wiesen deshalb ein Merkmal der Glykoside auf. Die Fragment-Ionen mit m/e 469 und 468 oder 485 und 484 können sich durch die B-Spaltung und fortgesetzte Wasserstoffeliminierung stabilisieren. Durch ein RDA-Zerfall und weitere COOH-Eliminierung erscheinen respektiv sowohl die Ionen mit m/e 232, 187 wie 248 und 203 mit sehr grosser Intensität.



Schema 3. Fragmentierung von Oleanolsäure- und Hederagenin-3,28-O-bis-Glykoside Permethylyate

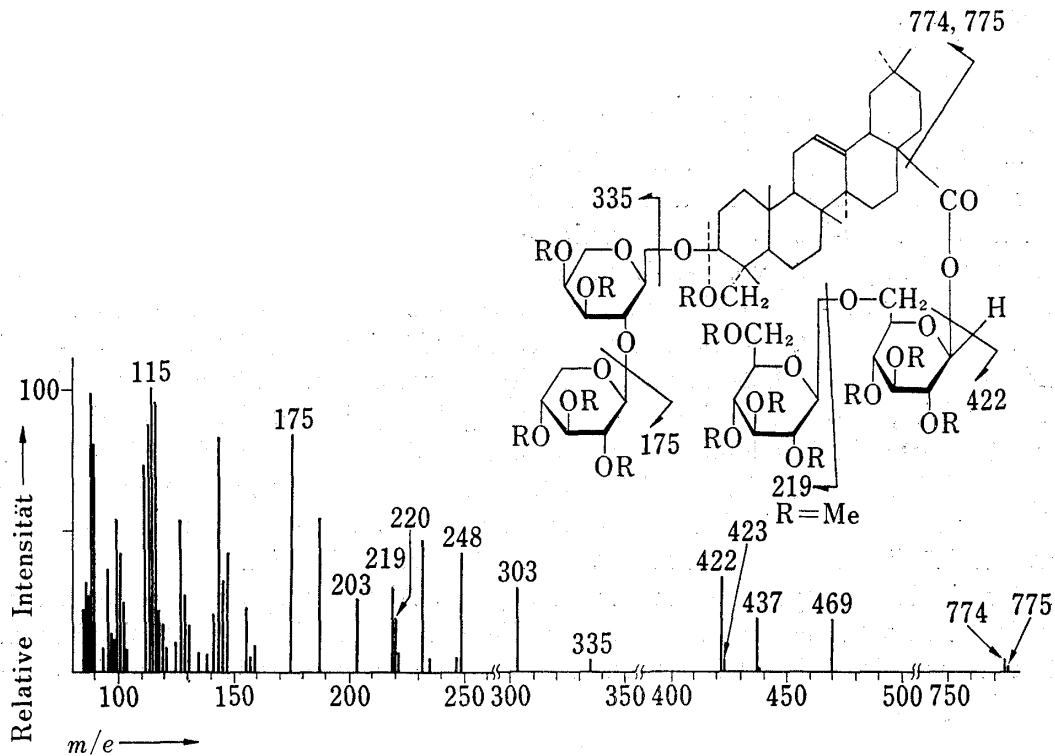


Fig. 6. Massenspektrum von XVI

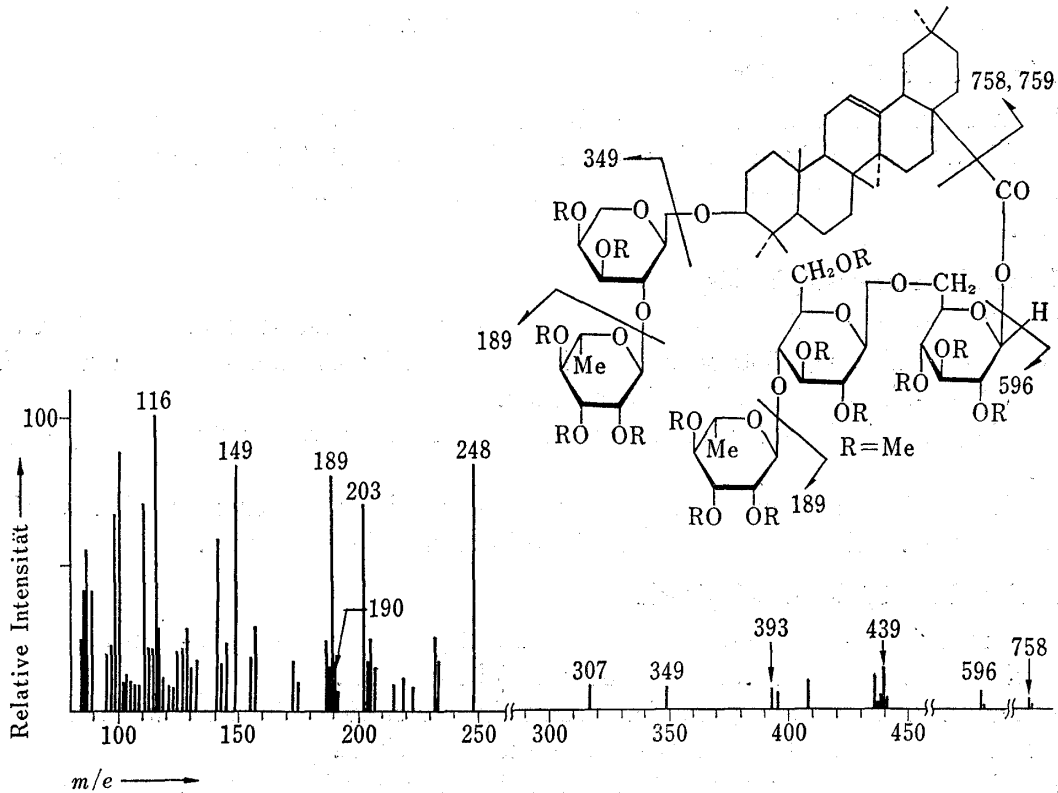


Fig. 7. Massenspektrum von XX

3,28-O-bis-Glykosid

Hederagenin- und Oleanolsäure-bisglykosid Permethyle (XIII—XX) lieferten kein M-Ion, sondern bildeten die aus der B-Spaltung herrührenden Ionen bei grösster Massenzahl, wie die Ionen m/e 614 und 615 im Fall von XIII, XIV und XVIII oder die Ionen m/e 758 und

759 im Fall von XX oder die Ionen m/e 774 und 775 im Fall von XV und XVI und weiter die Ionen m/e 788 und 789 im Fall von XIX und ferner die Ionen m/e 818 und 819 im Spektrum von XVII beobachtet worden sind.

In allen Spektren der Hederagenin-glykoside liessen sich die Ionen mit m/e 469 ($C_{31}H_{49}O_3$), 437 ($469 - CH_3OH$), 423 ($C_{30}H_{47}O$), 248 ($C_{16}H_{24}O_2$), 220 ($C_{15}H_{24}O$) und 203 ($C_{15}H_{23}$) erkennen und zwar sie waren ausser den Ionen mit m/e 220 und 203 dem Glykosid eigentümlich, weil sie im Fall von 23-O-Methyl Hederageninmethylester nicht auftraten. Das Ion m/e 423 wurde auch in den Spektren von 3-O-Glykoside beobachtet, wie schon oben beschrieben wurde. Die charakteristische A- und B'-Spaltung und fortgesetzte Wasserstoffumlagerung entstanden dagegen das Ion m/e 469, das nach einem RDA-Zerfall im Vergleich zu dem 3- und 28-O-Glykoside auch hier gleichfalls zu intensiven Ionen mit m/e 220, 248 und 203 führte.

Auffallend ist, dass starke Signal m/e 422 ($C_{19}H_{34}O_{10}$) immer dann erscheint, wenn sich die permethylierte Glukosylglucose-rest an der 28-COOH-gruppe glykosidisch verbinden liessen (XIV, XVI und XVII). Gleiches gilt auch für die Ionen m/e 218 im Fall von XIII und XV oder m/e 596 im Spektren von XVIII und XIX. Deshalb kann man annehmen, dass das geradzählige Ion den 28-Esterglykoside charakteristisch ist.

Das terminale Hexopyranosylkation und die durch A'-Spaltung hervortretenden ungeradzähligen Ionen wurden auch in allen Spektren dieser Hederagenin-bis-Glykoside beobachtet.

Oleanolsäure bis-Glykosid XX verhält sich massenspektrometrisch gleichfalls wie obene Hederageninglykoside.

Schluss

Aus obigen Ergebnisse wurden folgende Schlüsse erhalten.

I. Merkmal des 3-O-Glykosids

- 1) In allen Spektren werden die M- und (M-COOCH₃)-Ionen gefunden.
- 2) Die aus der A-Spaltung herrührenden Ionen von Aglykonteil und die aus der A'-Spaltung herkommenden ungeradzählige Ionen von Zuckerteil sind diesem Glykosid charakteristisch.

II. Merkmal des 28-O-Glykosids

- 1) Die aus der B'-Spaltung und fortgesetzter Wasserstoff-addition herrührenden Säuretyp-Ionen (z.B., m/e 530 oder 514) sind charakteristisch und sie konnten im Fall von 3-O- und 3,28-O-bis-Glykoside nicht beobachten.
- 2) Die geradzähligen Ionen, die auf den Zuckerteil zurückzuführen sind, sind eigentümlich.
- 3) Durch die B-Spaltung unter Wasserstoff-eliminierung wurden die charakteristischen Ionen beobachtet. Sie waren beim 3-O-Glykosid nicht gekennzeichnet.

III. Merkmal des 3,28-O-bis-Glykosid

- 1) Durch die A- und B'-Spaltungen und fortgesetzte Wasserstoff-addition wurden die charakteristischen Ionen (z.B., m/e 439 oder 469) beobachtet.
- 2) Durch die B-Spaltung und fortgesetzte Wasserstoff-eliminierung wurden die charakteristischen Ionen wie im Fall von 28-O-Glykosid beobachtet.
- 3) Die von A'-Spaltung ausgehenden, und ferner terminale ungeradzählige Ionen und die von B'-Spaltung herkommenden geradzähligen Ionen wurden charakteristisch im Fall dieses Glykosids als die Fragmente des Zuckerteils anerkannt.

Anerkennung Fräulein H. Kawamura in unserer Fakultät danken wir für ihre geschickte Aufnahme bei den massenspektrometrischen Arbeiten.