

## Massenspektren von Triterpensaponin-permethylat des Oleanantyps

RYUICHI HIGUCHI, TETSUYA KOMORI, und TOSHIO KAWASAKI

Fakultät für Pharmazeutische Wissenschaften der Universität Kyushu<sup>1)</sup>

(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 Methylat 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,<sup>2)</sup> Dammarantyp Triterpensaponine<sup>3)</sup> und Steroidsaponine.<sup>4)</sup> Kochetkov und Mitarbeiter<sup>5)</sup> 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<sup>6,7)</sup> 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.<sup>6,7)</sup> Permethylyate wurden nach Kuhn<sup>8)</sup>-oder Hakomori<sup>9)</sup>-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  $\mu$ 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<sup>-9</sup> 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

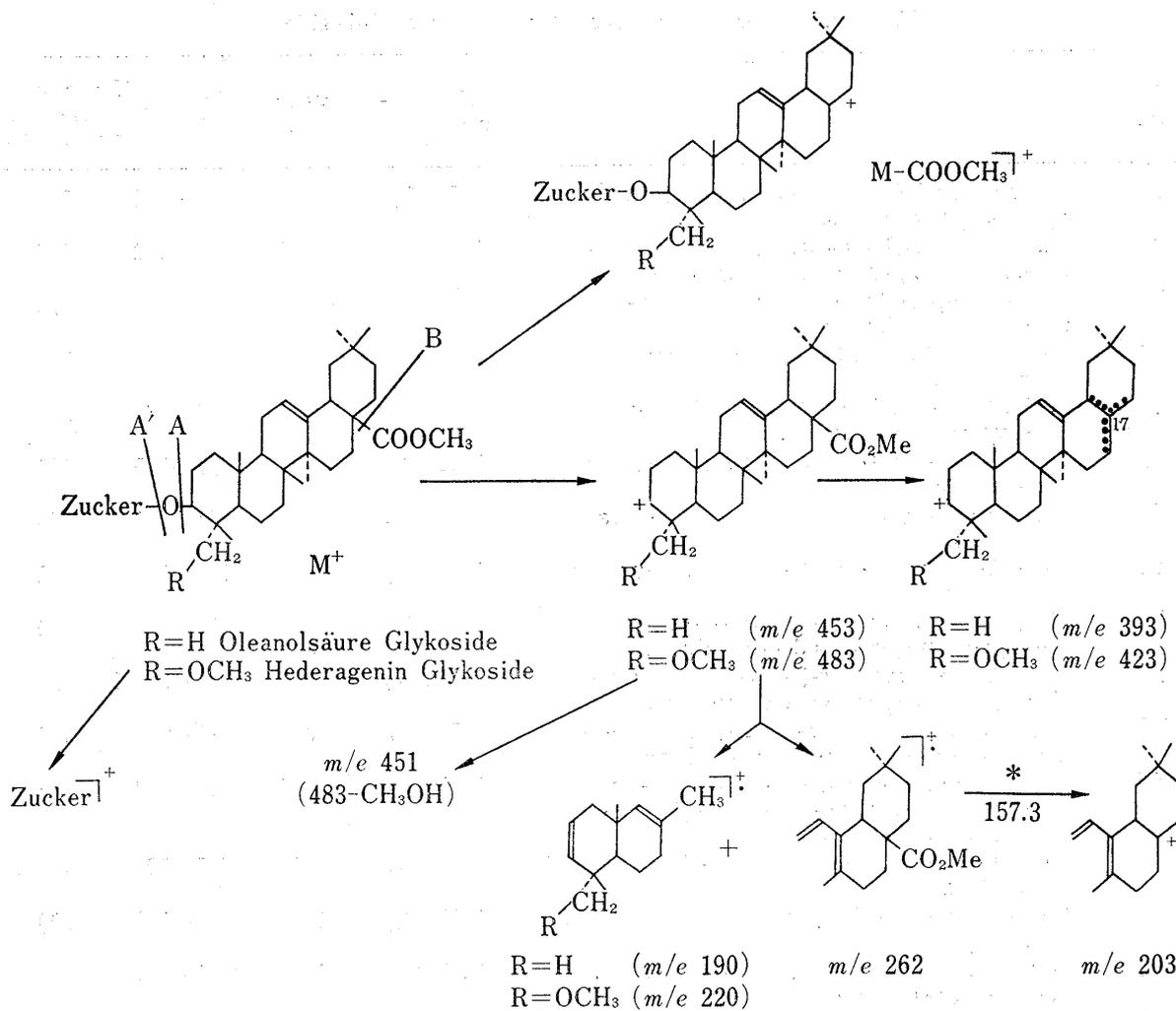
Verbindung Nr.	Name	Molekularformel	Molekulargewicht	Schmp. (°C)	Temp. in Ionisierungskassette (°C)
I	Oleanolsäure(Ol. sre)3-O- $\alpha$ -L-arabino(ara)-pyranosid Permethylat	C <sub>39</sub> H <sub>64</sub> O <sub>7</sub>	644	180—182	140
II	Ol. sre 3-O- $\alpha$ -L-rhamn(rha)pyranosyl(pyr)-(1→2)- $\alpha$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

## Ergebnis und Diskussion

### 3-O-Glykoside

In allen Spektren werden nun die Molekül (M)- und (M-COOCH<sub>3</sub>)-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 (C<sub>31</sub>H<sub>49</sub>O<sub>2</sub>) und 393 (C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>) erschienen. Wie schon Kochetkov und Mitarbeiter<sup>5)</sup> 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 Permethylate (\*Metastabile Ion)

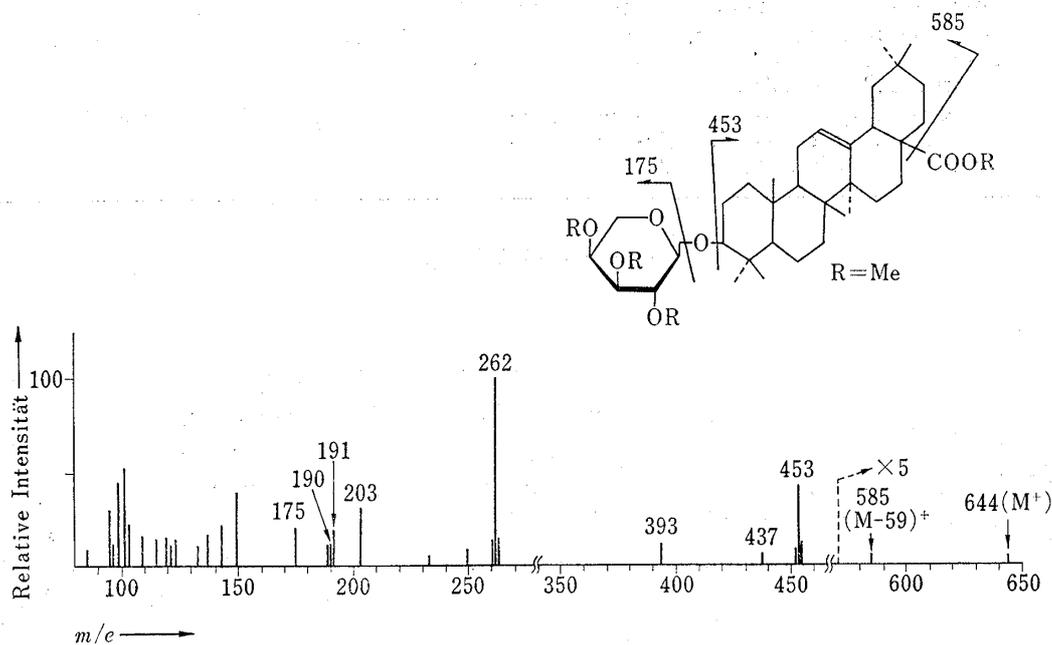


Fig. 1. Massenspektrum von I

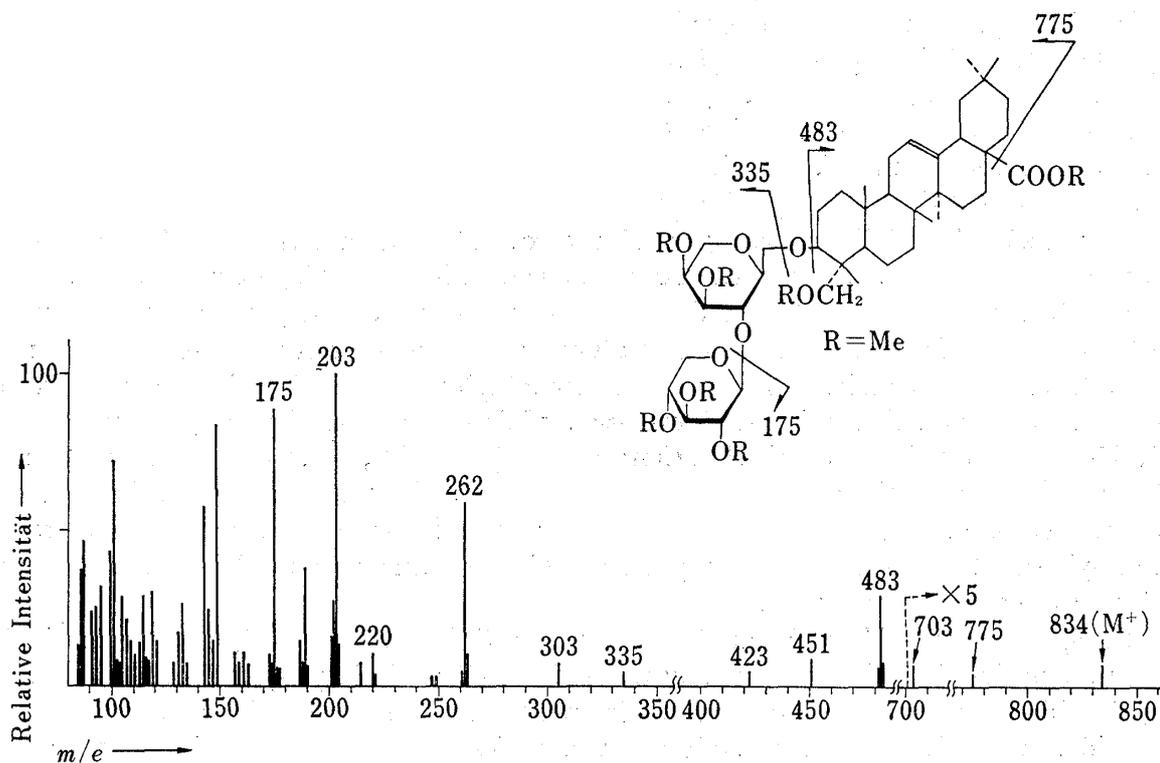


Fig. 2. Massenspektrum von V

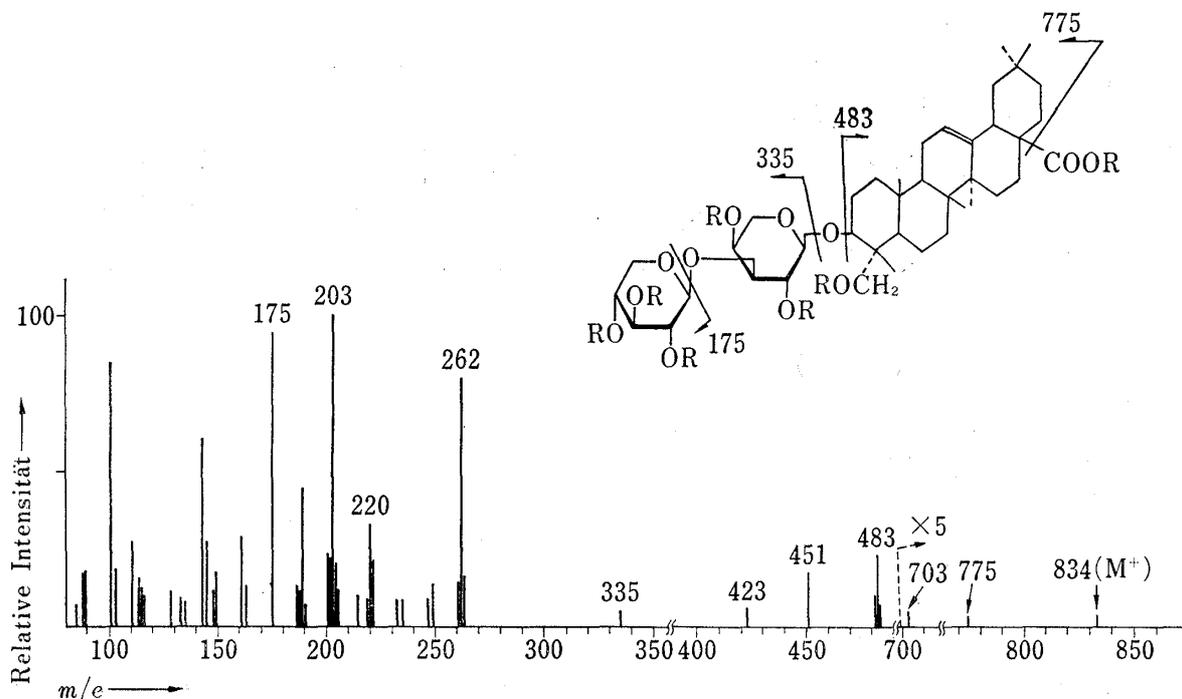


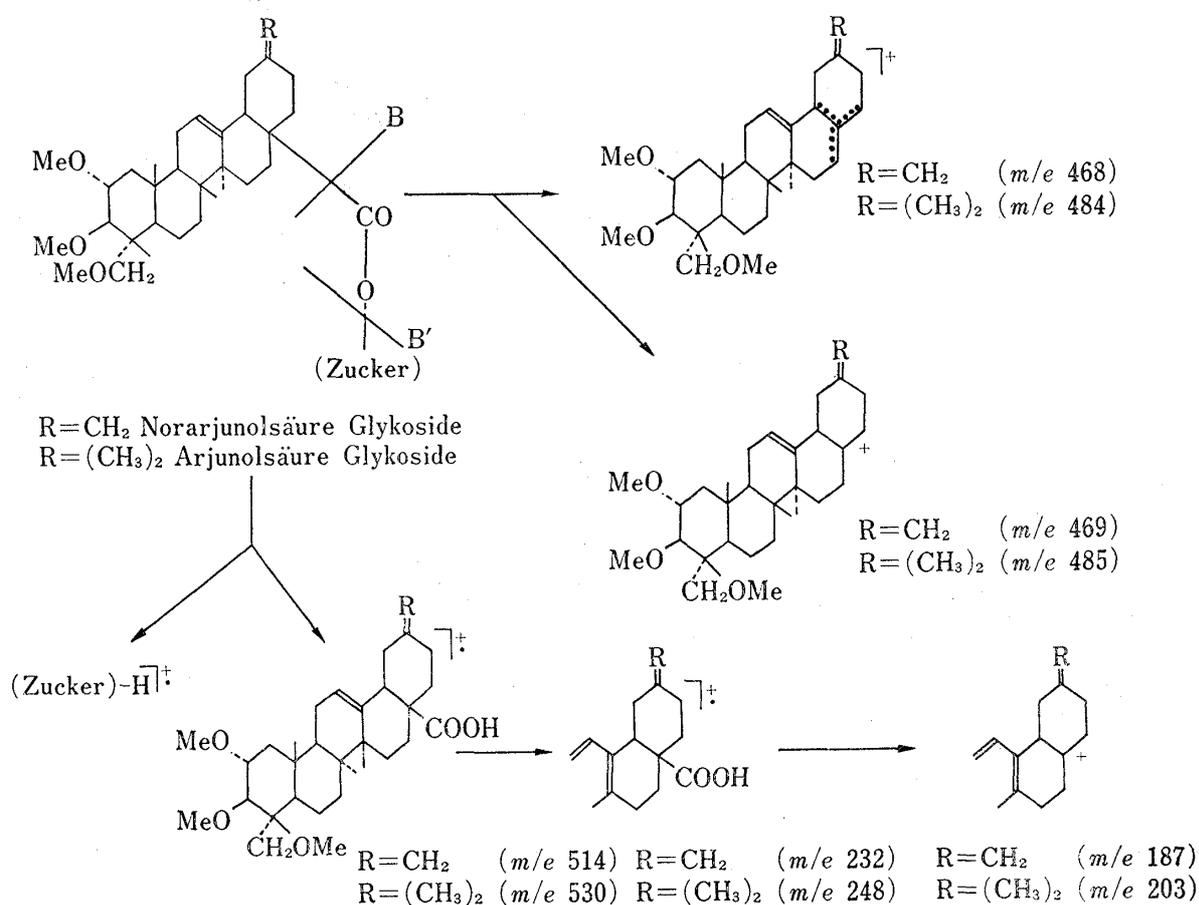
Fig. 3. Massenspektrum von VI

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-glykoside<sup>4)</sup> 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

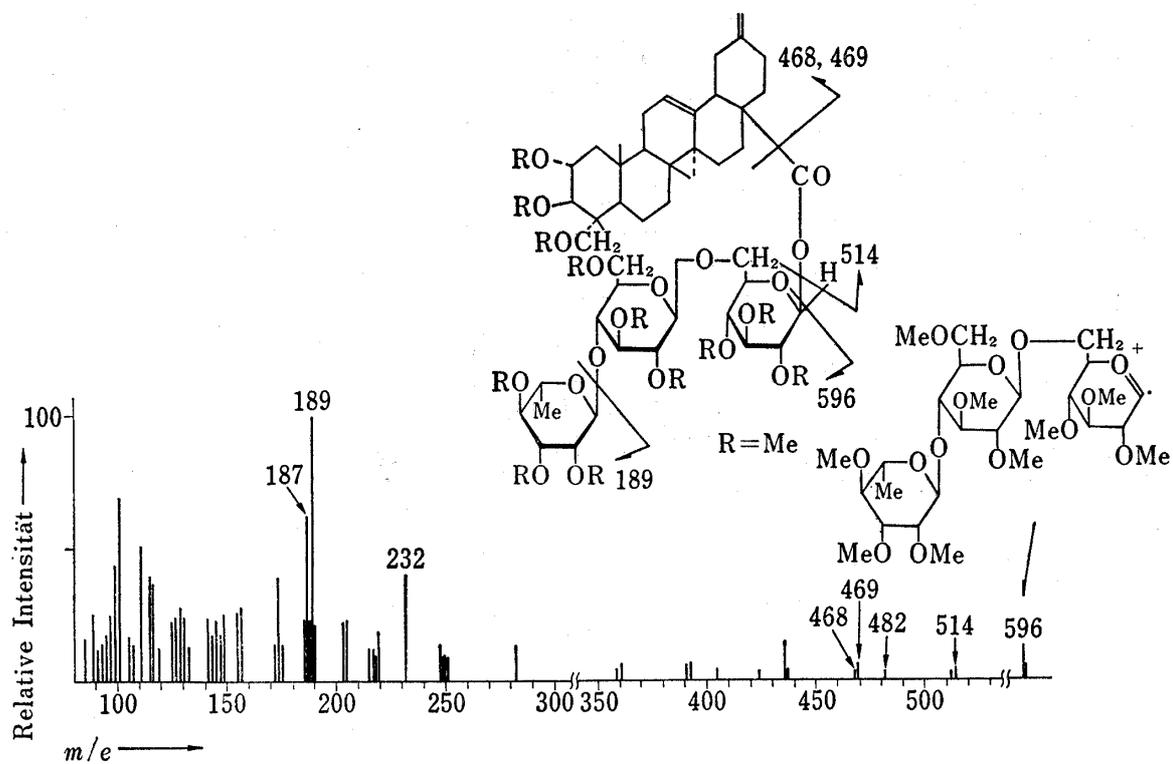


Fig. 4. Massenspektrum von XI

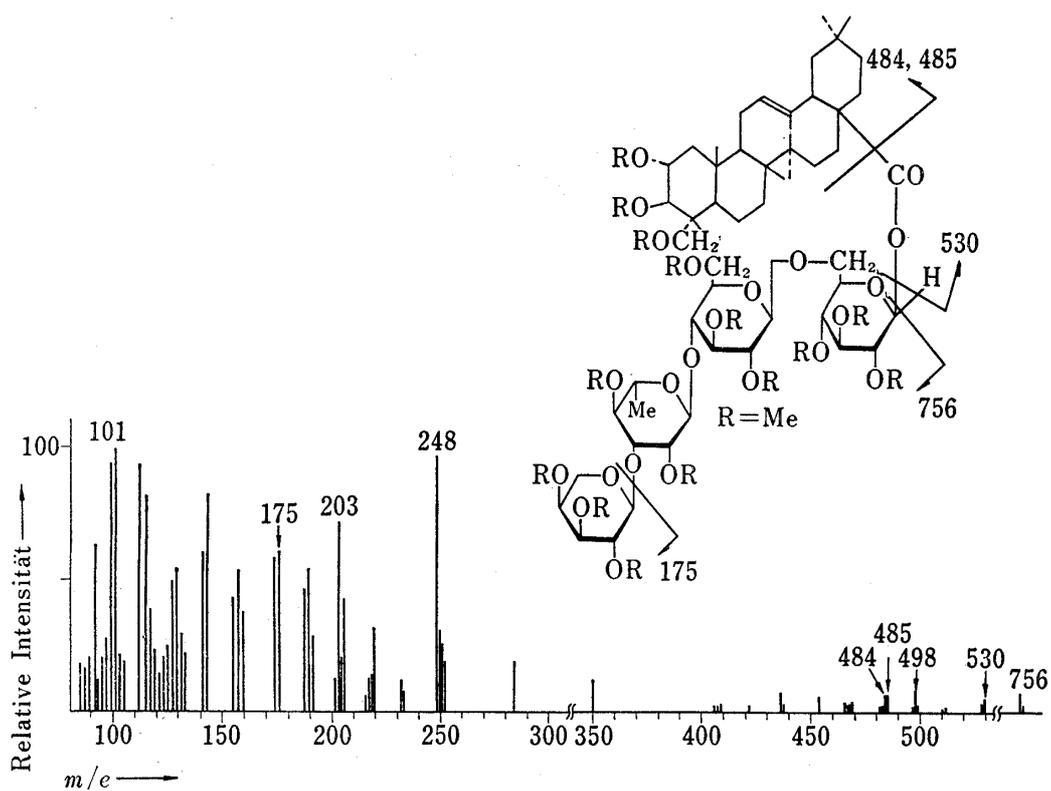
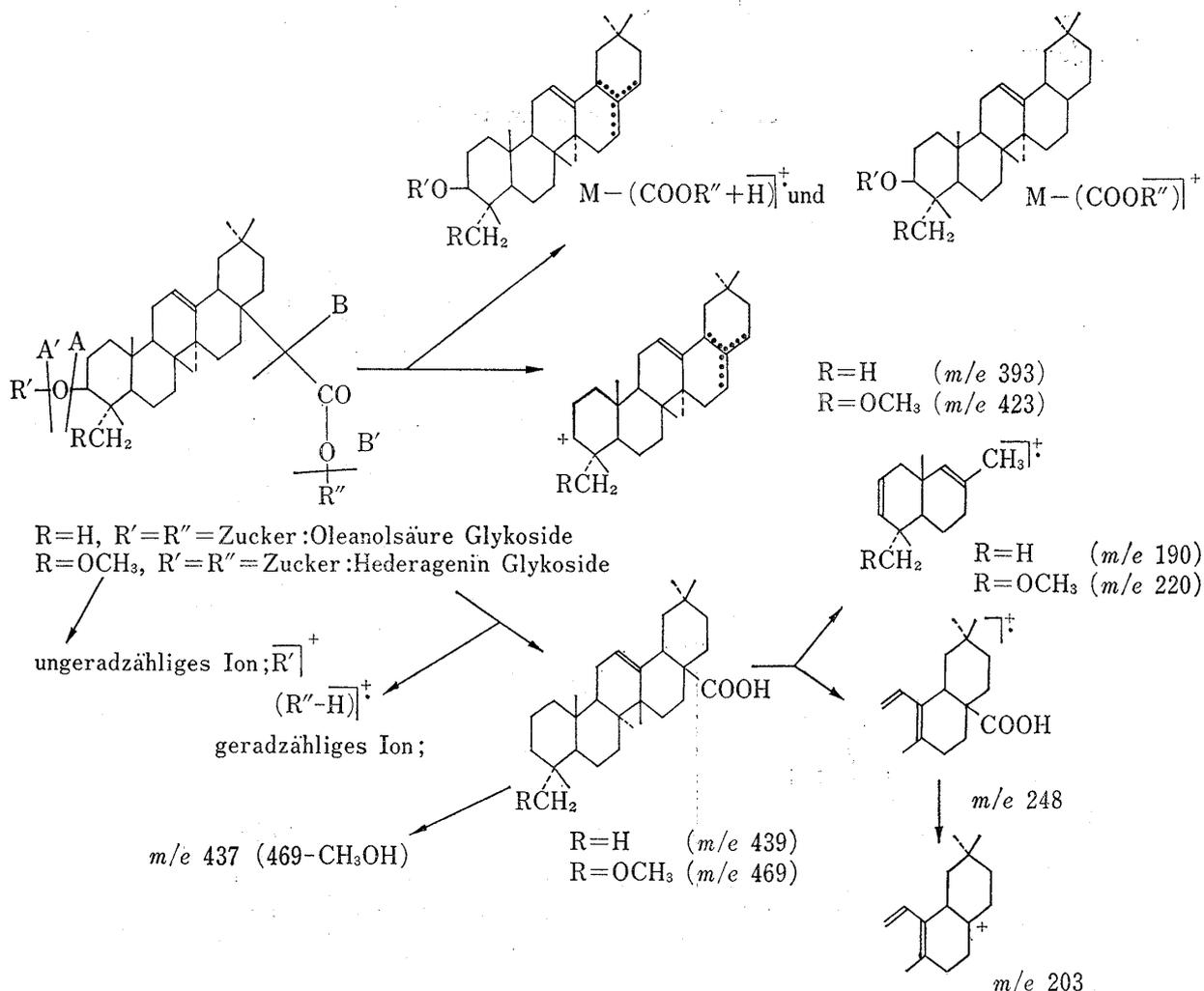


Fig. 5. Massenspektrum von XII

## 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

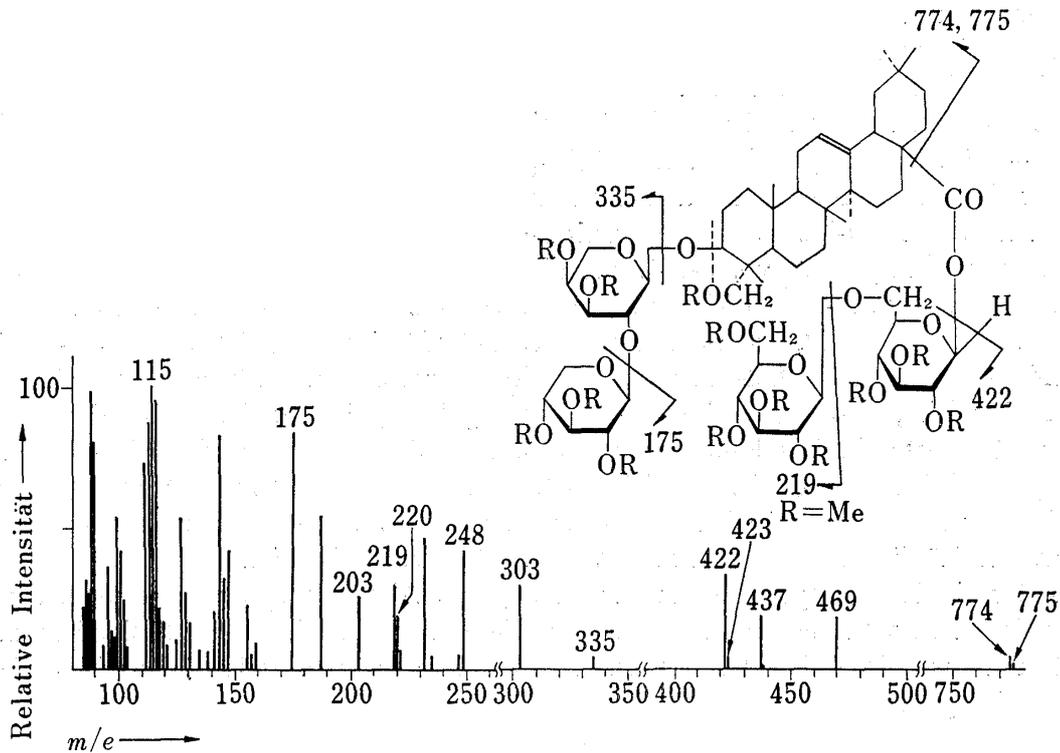


Fig. 6. Massenspektrum von XVI

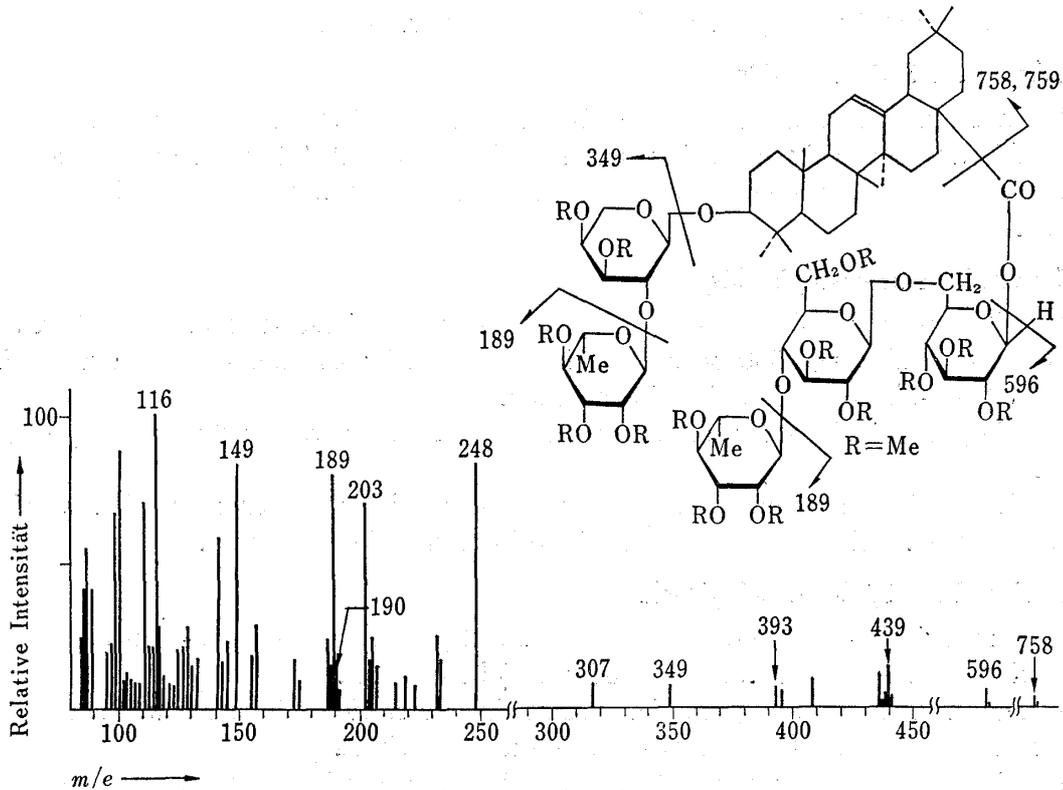


Fig. 7. Massenspektrum von XX

### 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-COOCH<sub>3</sub>)-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.