

Rudolf Tschesche, Gundolf Lüdke und Günter Wulff

Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette, II<sup>1)</sup>

## Sarsaparillosid, ein bisdesmosidisches 22-Hydroxy-furostanol-saponin

Aus dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 19. September 1968)

Sarsaparillosid (**2**) aus *Radix sarsaparillae* wurde als das bisdesmosidische Glykosid eines (25S)-5 $\beta$ -Furostan-triols-(3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26) erkannt. Am 3-OH befindet sich die gleiche Zuckerkette wie im Parillin (**1**), an das 26-OH ist D-Glucose gebunden, die enzymatisch mit  $\beta$ -Glucosidase leicht abgespalten werden kann. Es tritt Ringschluß zum Spirostanolglykosid Parillin ein, das ebenfalls in der Droge vorkommt. Die Struktur des Sarsaparillosids wurde durch oxydative Spaltung in das  $\Delta^{16}$ -Pregnenolon-glykosid (**20**) und das Glucosid der  $\delta$ -Hydroxy- $\gamma$ -methyl-valeriansäure (**17**) bewiesen. Die Hydrierung führt zum entsprechenden Glykosid des Dihydro-sarsasapogenins. Sarsaparillosid ist nicht hämolytisch oder antibiotisch aktiv und zeigt keine Komplexbildung mit Sterinen.

Nach der bisher gültigen Ansicht<sup>2)</sup> liegen die neutralen Steroidsaponine allgemein als Spirostanolglykoside vor, deren Kohlenhydratkomponenten über eine 3-OH-Gruppe des Aglykons gebunden sind. Marker<sup>3)</sup> hatte vermutet, daß Zucker in diesen Verbindungen auch über eine OH-Gruppe an C-26 oder C-16 der geöffneten Spiroketalgruppierung verknüpft sein könnten, diese Annahme glaubten Wall und Mitarbb.<sup>4,5)</sup> widerlegt zu haben, nachdem sie bei den von ihnen untersuchten Steroidsaponinen im IR die typischen Absorptionsbanden der Spiroketalgruppierung fanden und auch durch enzymatische Spaltung der Glykoside Aglykone mit Spirostanolstruktur erhielten. Vor kurzem jedoch konnten Schreiber und Ripperger<sup>6)</sup> am Monoglucosid eines Steroidalkaloids (Jurubin) zeigen, daß Zucker auch an einem OH der geöffneten Spiroketalseitenkette angreifen können.

Wir fanden jetzt erstmalig, daß Sarsaparillosid aus *Radix sarsaparillae* zwei unabhängige Zuckerketten an einem OH an C-3 und an C-26 eines Furostanolderivates gebunden enthält<sup>1)</sup>. Bei enzymatischer oder auch vorsichtiger saurer Hydrolyse geht das Furostanolderivat mit zwei Zuckerketten leicht in den bekannten Spirostanoltyp mit einer Zuckerkette am 3-OH über.

<sup>1)</sup> I. Mitteil.: R. Tschesche, G. Lüdke und G. Wulff, Tetrahedron Letters [London] 1967, 2785.

<sup>2)</sup> L. F. Fieser und M. Fieser, Steroide, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1961.

<sup>3)</sup> R. E. Marker und J. Lopez, J. Amer. chem. Soc. 69, 2389 (1947).

<sup>4)</sup> E. S. Rothman, M. E. Wall und C. R. Eddy, J. Amer. chem. Soc. 74, 4013 (1952).

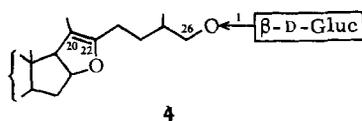
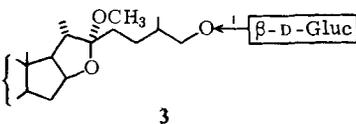
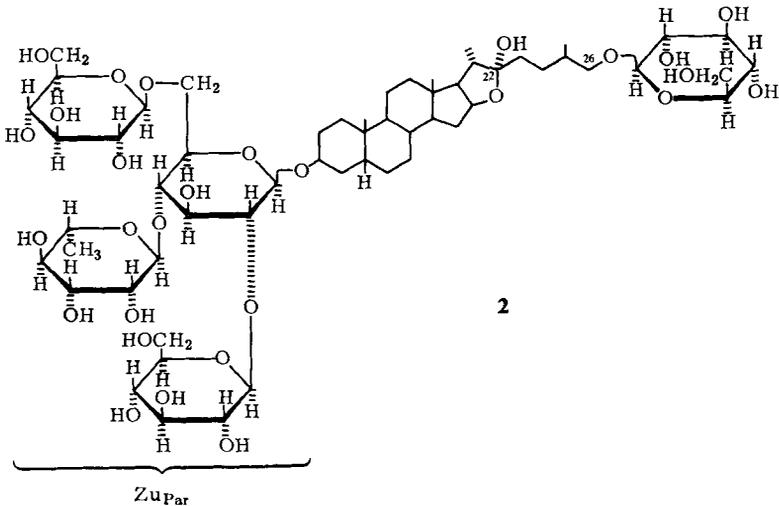
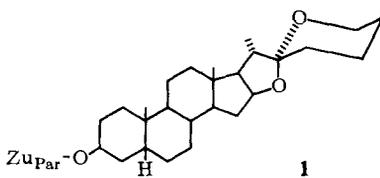
<sup>5)</sup> M. M. Krider und M. E. Wall, J. Amer. chem. Soc. 76, 2938 (1954); M. M. Krider, T. C. Cordon und M. E. Wall, ebenda 76, 3515 (1954).

<sup>6)</sup> K. Schreiber und H. Ripperger, Tetrahedron Letters [London] 1966, 5997; H. Ripperger, H. Budzikiewicz und K. Schreiber, Chem. Ber. 100, 1725 (1967).

Es wird vorgeschlagen, Saponine mit zwei unabhängigen Zuckerketten als bis-desmosidische und mit einer Zuckerkette als monodesmosidische Glykoside zu bezeichnen (desmós = die Kette)<sup>7a)</sup>.

### Die Struktur des Sarsaparillosids

Kürzlich haben wir über die Isolierung und Strukturermittlung des in Wasser schwerlöslichen Parillins (1) aus *Radix sarsaparillae* (Wurzeln der in Mittelamerika beheimateten Liliaceenart *Smilax aristolochiaefolia* Mill.) berichtet<sup>8)</sup>. Dieses tetraglykosidische Hauptsaponin enthält eine doppelt verzweigte Zuckerkette, die über die 3-OH-Gruppe des Sarsasapogenins verknüpft ist. Außerdem wurden zwei zuckerärmere Nebensaponine, das Desgluco-parillin und Desgluco-desrhamno-parillin beobachtet. In dieser Arbeit wurde bereits auf größere Anteile eines polareren und gut wasserlöslichen Saponins in der Droge hingewiesen, über dessen Strukturermittlung im folgenden berichtet wird.



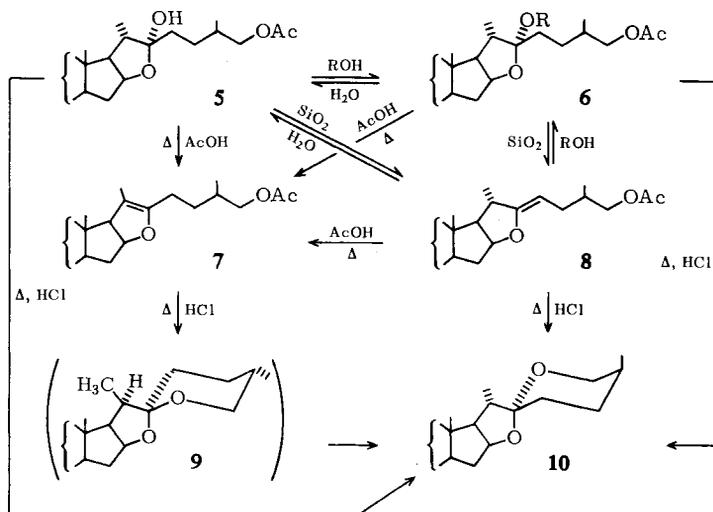
7) 7a) Ausführliche Diskussion der Nomenklaturfragen siehe l.c.7b); 7b) G. Wulff, Deutsche Apotheker-Zeitung **108**, 797 (1968).

8) R. Tschesche, R. Kottler und G. Wulff, Liebigs Ann. Chem. **699**, 212 (1966).

Zu seiner Isolierung dient der bei der n-Butanol/Wasser-Verteilung in die wäßrige Phase übergegangene Teil des Extraktes. Aus ihm werden durch Gelfiltration an Sephadex G 25 und anschließende Kieselgel-Säulenchromatographie zwei gut wasserlösliche Saponine, **2** und **3**, gewonnen, die sich leicht ineinander umwandeln. Diese Umwandlung von **2** nach **3** und umgekehrt läßt sich mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit methanolhaltigem Laufmittel nachweisen. Da man zur Isolierung von **2** und **3** auf die Chromatographie an Kieselgel in methanolhaltigen Laufmittelsystemen angewiesen ist, findet sich **2** stets mit **3** und **3** mit **2** verunreinigt.

Saponin **3** geht beim Stehenlassen mit sehr verdünnten wäßrigen Säuren in **2** über, während sich **2** mit Orthoameisensäure-methylester in **3** überführen läßt. Beide Reaktionen verlaufen quantitativ. Diese Befunde stehen in gutem Einklang mit der für Sarsaparillosid (Saponin **2**) aufgestellten Strukturformel. Dieses Glykosid zeichnet sich durch eine Hemiketalgruppierung an C-22 aus, während **3** das entsprechende Methylketal darstellt. **3** wird als 22-O-Methyl-sarsaparillosid bezeichnet. Es ist wohl keine genuine Substanz; sie entsteht erst bei der Isolierung mit Methanol enthaltenden Lösungsmitteln aus dem Hemiketal.

H. Hirschmann und F. B. Hirschmann<sup>9)</sup> beschreiben ähnliche Umwandlungen an analogen 22-Hydroxy-26-acetoxy-furostanolen (**5**). Diese Hemiketale gehen in Gegenwart von niederen Alkoholen in die entsprechenden Vollketale (**6**) über, die bei wäßriger saurer Hydrolyse die Hemiketale (**5**) zurückbilden. Daneben finden sie eine reversible Wasser- bzw. Alkoholabspaltung aus **5** bzw. **6** an Kieselgel zu den  $\Delta^{22}$ -Produkten (**8**). Aus **5**, **6** und **8** entsteht beim Kochen mit Eisessig ein  $\Delta^{20(22)}$ -Derivat (**7**), das nicht mehr zu den genannten Umwandlungen neigt. Beim Abspalten des Acetylrestes von C-26 cyclisieren **5**, **6** und **8** zu den zugehörigen Spirostanolen, während **7** zunächst die Cyclopseudoform (**9**) bildet und erst bei längerem Erhitzen in Säure in das Spirostanol (**10**) übergeht.



<sup>9)</sup> H. Hirschmann und F. B. Hirschmann, Tetrahedron [London] **3**, 243 (1958).

Da Sarsaparillosid und 22-O-Methyl-sarsaparillosid nicht in ausreichender Reinheit erhältlich sind, werden sie zur besseren Charakterisierung in das  $\Delta^{20(22)}$ -Derivat (**4**) übergeführt.

Dazu wird ein Gemisch von **2** und **3** mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert und durch anschließendes Kochen mit Eisessig das Peracetyl- $\Delta^{20(22)}$ -saponin (**14**) gebildet. Nach Entacetylierung und säulenchromatographischer Trennung an Kieselgel entsteht das aus Äthanol/Methanol kristallisierende  $\Delta^{20(22)}$ -Sarsaparillosid (**4**).

Die Substanzen **2**, **3** und **4** liefern bei der mineral-sauren Hydrolyse jeweils Sarsapogenin (**11**), das als Acetat identifiziert wird. Auch im Zuckeranteil unterscheiden sie sich nicht. Aus Proben von **4** wird das Zuckerverhältnis mittels quantitativer Gaschromatographie<sup>10</sup> der silylierten Methylglykoside ermittelt. Danach enthält das Molekül vier Mol D-Glucose und ein Mol L-Rhamnose.

Bei der enzymatischen Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucosidase (Schneckenferment) spalten **2** und **3** bevorzugt ein Mol D-Glucose ab. Man erhält in ca. 85 proz. Ausbeute Parillin (**1**), das in allen Eigenschaften mit authentischem Material übereinstimmt. Wie auch schon Schreiber<sup>6</sup>) festgestellt hat, verläuft demnach die Cyclisierung zum Spirostanol bereits in neutraler Lösung und nicht wie Wall und Mitarbb.<sup>5</sup>) annehmen nur in saurer Lösung.

Damit ist gezeigt, daß die Parillin-Struktur mit ihrer doppelt verzweigten Zuckerkette am 3-OH des Sarsapogenins auch im Sarsaparillosid enthalten sein muß.

Die Methylierung von **3** nach Kuhn und Mitarbb.<sup>11</sup>) bzw. von **4** nach Hakomori<sup>12</sup>) und die nachfolgende saure Spaltung liefert 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose, 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose und 3-Monomethyl-D-glucose im Verhältnis 3:1:1. Demnach wird gegenüber Parillin lediglich ein Molekül 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose mehr gebildet. Die zusätzliche Glucose im Sarsaparillosid muß daher endständig gebunden sein. Sie kann aber nicht am Zuckerteil des Parillins angreifen, da sonst andere Methylzucker hätten auftreten müssen. Da in dem zunächst als genuin angesehenen Sarsapogenin keine weiteren Sauerstoff-Funktionen zur Anknüpfung einer Glucose mehr vorhanden sind, muß angenommen werden, daß nicht Sarsapogenin, sondern das 5 $\beta$ -Furostan-triol-(3 $\beta$ .22 $\alpha$ .26) als Aglykon fungiert, das bei der Abspaltung der Glucose am 26-OH in Sarsapogenin übergeht.

Damit in Übereinstimmung steht, daß zwar Parillin wie Sarsapogenin die typischen IR-Absorptionen der Spiroketalgruppierung bei 845, 892 und 912/cm gibt, **2** und **3** jedoch nur eine schwache, verbreiterte Bande bei  $\sim 900$ /cm zeigen (s. Versuchsteil).

Zum Beweis der Furostanolstruktur mit Zuckerresten am 3-OH und am 26-OH wird **2** in Methanol bei Raumtemperatur mit Platin(IV)-oxid hydriert. Unter diesen Bedingungen können nur die Hemiketal-Verbindungen hydriert werden<sup>13</sup>), während in

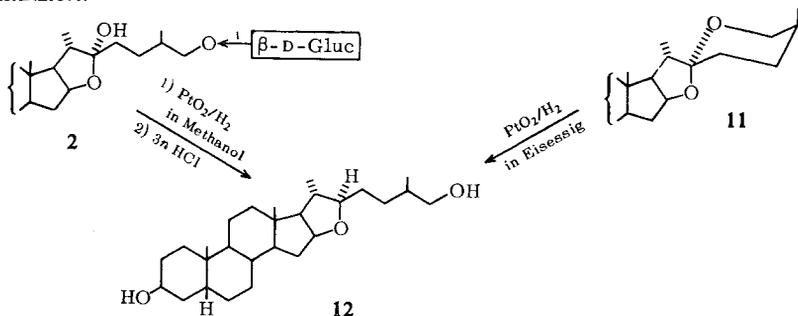
<sup>10</sup>) G. Wulff, J. Chromatography **18**, 285 (1965).

<sup>11</sup>) R. Kuhn, H. Egge, R. Brossmer, A. Gauhe, P. Klesse, W. Lochinger, E. Röhm, H. Trischmann und D. Tschampel, Angew. Chem. **72**, 805 (1960).

<sup>12</sup>) S. Hakomori, J. Biochemistry (Tokyo) **55**, 205 (1964); C. A. **60**, 15959 (1964).

<sup>13</sup>) R. Tschesche, B. T. Tjoa, G. Wulff und R. V. Noronha, Tetrahedron Letters [London] **1968**, 5141.

Eisessig auch die Spirostanole unter Öffnung von Ring F in ihre Dihydrogenine übergehen. Die Hydrolyse von hydriertem **2** liefert zu ca. 90% Dihydro-sarsasapogenin (**12**) neben wenig Sarsasapogenin. Das Dihydrogenin wird nach Säulenchromatographie rein erhalten und durch Vergleich mit authentischem Material identifiziert.

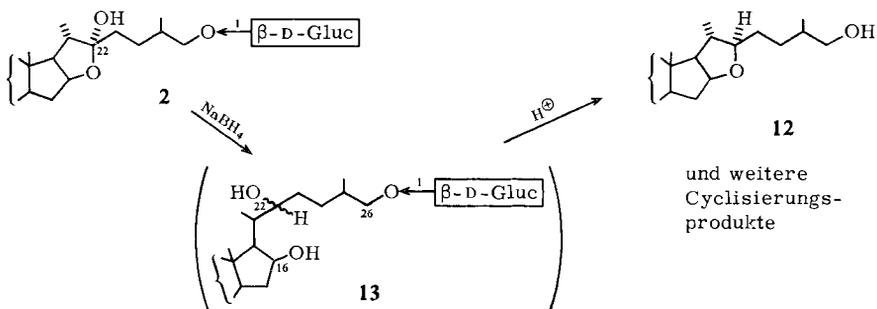


Ähnliche Hydrierungsergebnisse in neutraler Lösung erhält man auch beim Convallamarosid<sup>13</sup>, bei dem nach Hydrolyse als Aglykon zum größten Teil Tetrahydroconvallamarogenin auftritt. *Schreiber* und Mitarbb.<sup>6)</sup> führen beim Strukturbeweis des Jurubins eine ähnliche Hydrierung, allerdings in Eisessig, durch.

Die gute Hydrierbarkeit der 22-Hemiketal-Gruppierung in Methanol kann man zur Prüfung auf Bisdesmoside des Furostanoltyps nutzbar machen, sofern keine weiteren hydrierbaren Carbonylfunktionen vorliegen. Die zu untersuchenden genuinen und die daraus gewonnenen hydrierten Saponine werden jeweils sauer hydrolysiert und die Aglykone dünn-schichtchromatographisch verglichen. Sind beide Proben identisch, so gehört das Saponin nicht zu den 22-Hydroxy-furostanol-Derivaten, findet man aber als Hauptprodukt ein wesentlich polares Genin als das bei direkter saurer Hydrolyse erhaltene, so gehört das untersuchte Saponin wahrscheinlich dem neuen Strukturtyp an.

Auf diesem Wege läßt sich nachweisen, daß die Blattsaponine aus *Digitalis lanata* und *Digitalis purpurea* zum erheblichen Teil ebenfalls 22-Hydroxy-furostanol-Derivate mit zwei Zuckerketten sind.

Einen weiteren Hinweis auf die Hemiketalgruppierung des Sarsaparillosids liefert die Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  in wäßriger Lösung. Nach saurer Hydrolyse wird das entstandene Aglykongemisch aufgetrennt. Man erhält neben nicht reduziertem Sarsasapogenin (20%) eine Mischung von polaren Produkten, von denen Dihydro-sarsasapogenin (**12**) (11%) und ein Isomeres (25%) von ihm rein isoliert werden.



Die  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion von **2** führt vermutlich zu einem Derivat des 3.16.22.26-Tetrahydroxy-koprostans (**13**), das säurelabil ist<sup>14)</sup> und nach der Hydrolyse unter Wasserabspaltung eine Mischung von verschiedenen Cyclisierungsprodukten liefert.

Spirostanole selbst werden unter diesen Bedingungen mit Natriumborhydrid nicht angegriffen.

Da die Hydrierung und  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion des Sarsaparillosids in erster Linie die Hemiketalgruppierung an C-22 beweisen, aber noch keine Aussage über eine an C-26 gebundene Kohlenhydratkomponente geben, wird zum Beweis für die bis-glykosidische Natur von **2** ein oxydativer Abbau mit Chromsäure ausgeführt. Dazu geht man von peracetyliertem  $\Delta^{20(22)}$ -Sarsaparillosid (**14**) aus. Dieses wird nach Art eines *Marker*-Abbaus, wie bei Wall et al.<sup>15)</sup> beschrieben, mit  $\text{CrO}_3$  in Eisessig bei Raumtemperatur zu einem Esterketon (**15**) oxydiert und dieses mit Kalium-tert.-butylat gespalten. Man findet so zwei Bruchstücke des Saponins, die beide sowohl einen Teil des Genins als auch je einen Teil der Zuckerbausteine enthalten. Es sind dies einmal ein  $\Delta^{16}$ -Pregnenolon-glykosid (**20**) (21 C-Atome des genuinen Aglykons) mit der Zuckerkette des Parillins an C-3, zum anderen ein Säureglucosid (**17**) (mit 6 C-Atomen des Aglykons, C-22 bis C-27), das aus  $\delta$ -Hydroxy- $\gamma$ -methyl-valeriansäure besteht und am  $\delta$ -C-Atom einen Glucoserest glykosidisch gebunden enthält.

Das Pregnenolon-glykosid trennt man durch n-Butanolextraktion vom Säureglucosid ab und gewinnt nach säulenchromatographischer Reinigung eine aus Alkohol kristallisierende Verbindung (**20**). Die HCl-Hydrolyse liefert ein  $\Delta^{16}$ -Pregnenolon, das in Form des Acetats (**19**) mit aus Smilagenin gewonnenem  $3\beta$ -Acetoxy- $5\beta$ -pregnen-(16)-on-(20) in allen Eigenschaften übereinstimmt.

Das  $\delta$ -Hydroxy- $\gamma$ -methyl-valeriansäure-glucosid (**17**) wird nach Acetylierung als wasserlösliches Acetat von anderen acetylierten wasserunlöslichen Glykosiden (Nebenprodukte der Chromsäureoxydation) abgetrennt und in den Tetraacetatmethylester (**16**) übergeführt. Das Protonenresonanzspektrum (s. Versuchsteil) belegt die Struktur.

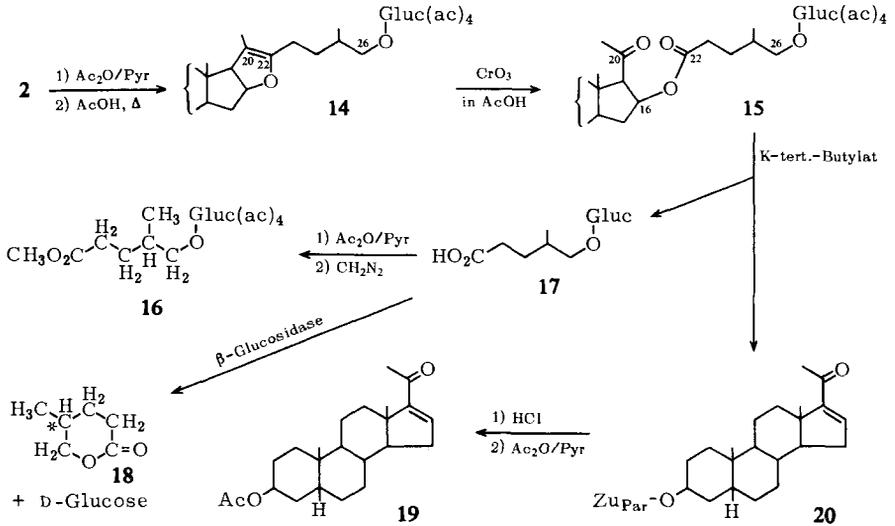
Auch das Massenspektrum (mit Hochauflösung) bestätigt die angenommene Struktur **16** (Abbild.). Es zeigt die typischen Peaks<sup>16, 17)</sup> für eine acetylierte Glucose bei  $m/e = 331, 243, 242, 200, 169, 157, 145, 141, 140, 115, 109, 103$  und  $98$ . Daneben treten die charakteristischen Fragmente des Säureteils bei  $m/e = 129$  und  $97$  auf. Der Peak von  $m/e = 129$  ( $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2$ ) entspricht einer homolytischen Spaltung der Glykosidbindung, während die Masse  $97$  durch zusätzliche Abspaltung von Methanol ( $M = 32$ ) aus dem  $129$ er Fragment hervorgeht. Der für diesen Übergang charakteristische metastabile Peak der Masse  $\sim 73$  tritt ebenfalls auf. Eine Masse entsprechend dem Molekül-Ion kann nicht gefunden werden; dies ist für ein derartiges Zuckerderivat auch nicht zu erwarten.

<sup>14)</sup> F. C. Uhle, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1460 (1961); Anmerkung 12.

<sup>15)</sup> M. E. Wall, H. E. Kenney und E. S. Rothman, J. Amer. chem. Soc. **77**, 5665 (1955).

<sup>16)</sup> K. Heyns und H. Scharmann, Liebigs Ann. Chem. **667**, 183 (1963).

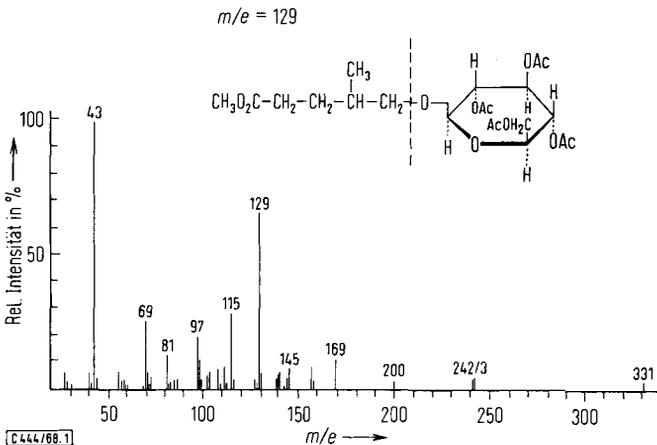
<sup>17)</sup> K. Biemann, D. C. De Jongh und H. K. Schnoes, J. Amer. chem. Soc. **85**, 1763 (1963).



Die Struktur des Säureglykosids **17** wird ferner durch enzymatische Spaltung mit  $\beta$ -Glucosidase gestützt. In hoher Ausbeute entstehen dabei D-Glucose und das  $\delta$ -Lacton **18** der  $\delta$ -Hydroxy- $\gamma$ -methyl-valeriansäure.

Dieses Lacton wird durch Protonenresonanzspektrum und Massenspektrum ( $M^+ = 114$ ) eindeutig charakterisiert. Es ist linksdrehend ( $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ ) und besitzt gemäß der Chiralität von C-25 *S*-Konfiguration.

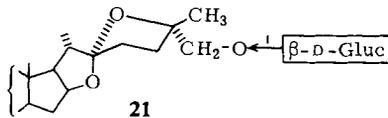
Durch Untersuchungen an frischem Pflanzenmaterial von *Smilax aristolochiaefolia* müßte geprüft werden, inwieweit neben dem Sarsaparillosid auch die zuckerärmeren Glykoside, Parillin, Desgluco-parillin und Desgluco-desrho-mo-parillin in der Pflanze selbst vorliegen. Es ist denkbar, daß diese ganz oder teilweise erst bei der Trocknung der Droge entstehen.



Massenspektrum von  $\delta$ -Hydroxy- $\gamma$ -methyl-valeriansäure-methylester-glucosid-tetraacetat (**16**);  
Gerät MS 9 der A. E. J.

## Diskussion

Der am Sarsaparillosid erstmalig aufgefundene und bewiesene Strukturtyp der bisdesmosidischen 22-Hydroxy-furostanol-saponine ist wahrscheinlich in der Natur weit verbreitet. Wie inzwischen für das Hauptsaponin aus *Convallaria majalis* (Maiglöckchen), Convallamarosid<sup>13)</sup>, bewiesen und für die Blattsaponine von *Digitalis lanata* und *purpurea* durch Natriumborhydrid-Reduktion wahrscheinlich gemacht worden ist, liegen auch hier Saponine des neuen Strukturtyps vor. Nahe verwandt mit diesem Typ sind auch die bisdesmosidischen Saponine aus *Avena sativa* (Hafer), die Zucker am 3-OH und am 26-OH eines Furano-furostanols (**21**) gebunden enthalten<sup>18)</sup>.



Die biologischen Eigenschaften des neuen Saponintyps unterscheiden sich signifikant von denen der monodesmosidischen Spirostanolglykoside. Sie besitzen keine hämolytische Aktivität, es fehlen ihnen die bakteriostatischen und fungiciden Eigenschaften und sie bilden keine schwerlöslichen Cholesterinkomplexe. Als einzige typische Saponineigenschaft ist noch die Schaumbildung ihrer wäßrigen Lösungen erhalten geblieben.

In der Tabelle sind die genannten Eigenschaftsunterschiede am Beispiel von Parillin und Sarsaparillosid dargestellt.

Eigenschaften von Parillin und Sarsaparillosid <sup>7b)</sup>

Eigenschaften	Parillin	Sarsaparillosid
Hämolyse	1 : 151000	1 : <1200
Cholesterin-Fällbarkeit	fällbar	nicht fällbar
Fungicide Wirksamkeit gegen: <i>Candida albicans</i> 504	16 γ/ccm	keine Aktivität bis 10 mg/ccm
<i>Trichoderma mentagrophytes</i> 526	4 γ/ccm	keine Aktivität bis 10 mg/ccm

Diese unterschiedlichen Eigenschaften der Saponine mit einer und mit zwei Zuckerketten lassen eine Unterscheidung als Mono- und Bisdesmoside als notwendig erscheinen. Diese Bezeichnungweise läßt sich auch für bereits bekannte Triterpensaponine mit einer und zwei unabhängigen Zuckerketten übernehmen. Die Triterpensaponine mit zwei Zuckerketten haben eine Glykosid- und eine Acylglykosidbindung, sie würden bei der ursprünglich gewählten Bezeichnungweise „bisglykosidisch“ begrifflich nicht exakt erfaßt werden. Im Falle der Hederasaponine (aus Efeu) besitzt das bisdesmosidische Hederasaponin C keine hämolytische oder fungicide Wirksamkeit, während das daraus durch enzymatische Spaltung gewonnene monodesmosidische α-Hederin diese Eigenschaften hat <sup>7b)</sup>.

<sup>18)</sup> R. Tschesche, M. Tauscher, H.-W. Fehlhaber und G. Wulff, Chem. Ber., im Druck.

Wir werden künftig die Zugehörigkeit der Saponine zu einem der beiden Typen auch im Namen kenntlich machen. Monodesmoside werden die Endung „in“, Bisdesmoside die Endung „id“ tragen. Dieses Prinzip kam bereits bei den Bezeichnungen Parillin und Sarsaparillosid zur Anwendung.

Es ist möglich, daß sich bisdesmosidische Furostansaponine wegen der fehlenden hämolytischen Aktivität bisher ihrer Entdeckung entzogen haben. Vielfach werden nämlich nur solche Drogen als saponinhaltig angesprochen, die einen positiven Hämolysetest aufweisen. Es erscheint daher auch die Zuordnung dieser neuen Glykoside zu den Saponinen in gewisser Weise problematisch, denn den Bisdesmosiden fehlen gerade diejenigen Eigenschaften, aufgrund deren die Zuordnung zu den Saponinen bisher erfolgt ist. Wir möchten aber zunächst bis zu einer Neuformulierung des Saponinbegriffs wegen der engen Verwandtschaft dieser Verbindungen mit den Saponinen sie in dieser Gruppe belassen.

Bisdesmoside stellen für die Pflanze offenbar antibiotisch inaktive Vorstufen dar. Sie finden sich als gut wasserlösliche Substanzen vor allem in stoffwechselaktiven Teilen der Pflanzen und können bei Verletzung der Zellen enzymatisch in die antibiotisch wirksamen Monodesmoside übergehen. Auch in anderen Fällen ist bekannt, daß in Pflanzen zunächst Vorstufen antibiotisch wirksamer Substanzen gebildet werden, die erst durch Enzyme in die aktiven Substanzen übergehen. Die monodesmosidischen Saponine sind allerdings sicher nicht obligat an das Vorkommen in Form höher glykosidierter Bisdesmoside gebunden, denn erstere sind auch genuin in vielen Pflanzen bzw. ihren Teilen in höherer Konzentration anzutreffen. Sie werden dort z. B. in Samen, Knollen oder Wurzeln abgelagert; dies schließt jedoch nicht aus, daß die bisdesmosidische Form auch hier den Transport in der Pflanze übernimmt.

Wir danken Herrn Dr. *H.-W. Fehlhaber* für die Anfertigung und Interpretation der Massenspektren, Fräulein *Winterfeld*, Fräulein *Gerusel* und Herrn *Lander* für weitere Analysen und Messungen, dem *Landesamt für Forschung*, Düsseldorf, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und der *Stiftung Volkswagenwerk* für die zur Verfügung gestellten analytischen Geräte.

## Beschreibung der Versuche

Die *Schmelzpunkte* wurden mit einem Mikroskopheiztisch nach *Kofler-Weygand* bestimmt. Die Messung der *optischen Drehung* erfolgte mit einem Polarimeter 141 von Perkin-Elmer. Die *IR-Spektren* wurden (in  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CCl}_4$  oder  $\text{KBr}$ ) mit dem Spektrophotometer Perkin-Elmer, Modell 221, mit Gitter-Prismenaustauscheinheit, die *Protonenresonanzspektren* mit dem Gerät Varian A 60 (in  $\text{CDCl}_3$  und  $\text{D}_2\text{O}$ ) mit Tetramethylsilan als internem bzw. externem Standard aufgenommen. Die *UV-Spektren* wurden mit dem Gerät Cary 14 gemessen. Die *Massenspektren* wurden mit den Geräten CH 4 der Atlas-MAT-GmbH bzw. MS 9 der A. E. I. (Auflösung 12000) ausgeführt. Die *C, H- und N-Analysen* sind im Mikroanalytischen Laboratorium Dr. F. Pascher, Bonn, angefertigt worden. Zur *Säulenchromatographie* benutzte man Kieselgel/Gebr. Herrmann, Köln, bzw. Aluminiumoxid neutral (Woelm, Eschwege). Wenn nicht anders vermerkt, kamen jeweils die Siebfractionen 71–90  $\mu$  zur Anwendung. Die *Dünnschichtchromatographie* wurde unter Verwendung von Kieselgel G (Merck) wie üblich ausgeführt<sup>19)</sup>. Es wurde mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1:2) oder mit Anilinphthalat in Isobutanol<sup>20)</sup> angesprüht. Für Saponine kam für die Dünnschicht- wie auch für die Säulen-

<sup>19)</sup> R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

<sup>20)</sup> S. M. Partridge, Nature [London] **164**, 443 (1949).

chromatographie meist das Laufmittelsystem a: Chloroform/Methanol/Wasser (65 : 35 : 10, untere Phase)<sup>21)</sup> zur Anwendung. Zur absteigend ausgeführten *Papierchromatographie* benutzte man das Papier von Schleicher & Schüll Nr. 2043b. Es wurde oft mit folgenden Elutionssystemen gearbeitet: System A: Essigester/Pyridin/Wasser (3.6 : 1 : 1.15, leichte Phase)<sup>22)</sup>. System B: n-Butanol/Wasser/Tetrachlorkohlenstoff (4 : 4 : 3, schwere Phase)<sup>23)</sup>. Zur *Gaschromatographie* benutzte man das Gerät F7/HF von Perkin-Elmer mit Integrator D2 und Kienzle Digital-Drucker. Als Detektor diente eine Wärmeleitfähigkeitszelle, Trägergas war Helium bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 25–30 ccm/Min. Einspritzblock und Detektor wurden auf 250°, der Säulenofen auf 180° geheizt.

#### Isolierung der Saponine

Bei der Anreicherung von Parillin aus *Radix sarsaparillae* (Handelssorte Veracruz) waren die Methanol/Wasser-Extrakte III–V angefallen<sup>8)</sup>. Deren Rückstand wurde 3 mal zwischen 4.5 l Wasser und 2 l n-Butanol verteilt. Während die Butanol-Phasen hauptsächlich Parillin und die unpolaren Saponine der Droge enthielten, finden sich in der Wasserphase die polarsten Saponine 2 und 3 (entsprechend h und i<sup>8)</sup>) neben vielen Farbstoffen und Oligosacchariden. Zur Vorreinigung dieses eingeeengten Extraktes wurden jeweils 20 g an 350 g Sephadex G 25 (Säulenabmessung 40 cm × 8 cm) mit dest. Wasser getrennt. Man erhielt nach Einengen jeweils 4–5 g eines noch Farbstoffe enthaltenden Gemisches, vorwiegend aus 2 und 3 bestehend.

Je 10 g dieses Materials wurden auf 50 g Kieselgel aufgezogen und zur Abtrennung der Hauptmenge an Farbstoffen und polarsten Substanzen über eine 50 g Kieselgelsäule geschickt (Elutionsmittel: System a). Man erhielt jeweils etwa 6.5 g Saponingemisch, das an ca. 25 g Adsorbens aufgezogen an einer 700 g Kieselgelsäule mit dem obigen Laufmittelsystem getrennt wurde. Fraktionierung: 1.2 g 3 (bis zu 10% 2 enthaltend); 2.2 g Gemisch von 2 und 3, ca. 1 : 1; 1.1 g 2 (bis zu ca. 15% 3 enthaltend).

Bei längerem Stehenlassen der methanolischen Lösung fallen 2 und 3 in drusenförmigen Kristallen von feiner nadeliger Struktur an; diese zerfließen jedoch beim Absaugen von der Mutterlauge und bilden beim Trocknen einen festen, leicht gelblichen Lack.

Drehungen: Saponin 2:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-44^\circ$  ( $c = 0.86$ , Wasser)

Saponin 3:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-48^\circ$  ( $c = 1.36$ , Wasser)

IR (in KBr): Es fehlen die für Spiroketale charakteristischen Absorptionen<sup>24,25)</sup>, die sich bei Spirostanolsaponinen, in KBr gemessen, sonst gut erkennen lassen<sup>24)</sup>. In dem entsprechenden Bereich findet sich bei 2 und 3 lediglich eine schwache, verbreiterte Bande bei  $\sim 900/\text{cm}$ .

Die *zweidimensionale Dünnschichtchromatographie* von 2 und 3 erfolgte an quadratischen Platten (20 × 20 cm<sup>2</sup> mit 10 g Kieselgel; 5 × 5 cm<sup>2</sup> mit 0.8 g Kieselgel). Man trägt dabei die Substanzen punktförmig in einer Ecke der Platte auf, entwickelt in die erste Laufrichtung und trocknet die Platte mit einem Fön ab. Wenn man sofort in die zweite Laufrichtung (senkrecht zur ersten) chromatographiert, finden sich fast ausschließlich Substanzen auf der Platten-Diagonalen, läßt man aber die Platte einen Tag und länger an der Laborluft oder in

<sup>21)</sup> T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. pharm. Bull. (Tokyo) **11**, 1546 (1963); C. A. **60**, 11850 (1964).

<sup>22)</sup> P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirota, G. Ruffini und A. Sartori, J. Chromatographie **3**, 343 (1960).

<sup>23)</sup> R. Tschesche und G. Wulff, Tetrahedron [London] **19**, 621 (1963).

<sup>24)</sup> R. Tschesche, G. Wulff und G. Ballé, Tetrahedron [London] **18**, 959 (1962).

<sup>25)</sup> M. E. Wall, C. R. Eddy, M. L. McClennan und M. E. Klumpp, Analytic. Chem. **24**, 1337 (1952).

methanolhaltiger Atmosphäre stehen, so treten neben den Diagonalflecken noch zwei Umwandlungsprodukte auf. Dabei ist die Umwandlung von **3** in **2** bevorzugt. ( $R_F$ -Werte: **2** = 0.16; **3** = 0.23).

Auch die an anderer Stelle beschriebenen methylierten bzw. acetylierten Saponine weisen unter gleichen Bedingungen ähnliche Umwandlungen auf.

**Ketalisierung:** Je 10 mg **2** wurden in 0.5 ccm wasserfreiem *Methanol* mit 0.5 ccm *Orthoameisensäure-methylester* versetzt. Nach Zugabe einer Spur konz. Schwefelsäure ließ man 1 Tag bei Raumtemperatur bzw. bei  $-20^\circ$  in einem verschlossenen Kölbchen stehen. Dann wurden 5 ccm  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung bis zur neutralen Reaktion zugegeben und das Methanol sowie überschüss. Ameisensäureester aus dem Ansatz i. Vak. abdestilliert. Die wäbr. Phase wurde zweimal mit *n*-Butanol ausgeschüttelt und schließlich die organische Phase zur Trockne eingedampft. Im Rückstand läßt sich dünnschichtchromatographisch (System a) nur noch **3** nachweisen. Man erhält dasselbe Bild, wenn man auf die alkalische Aufarbeitung verzichtet und direkt die saure Reaktionslösung chromatographiert. Bei längerem Stehenlassen in der Reaktionsphase treten bereits unpolare Produkte als **3** auf.

**Entketalisierung:** Je ca. 10 mg *Saponin 3* wurden in 0.5 ccm verd. Schwefelsäure bzw. Salzsäure (pH 2–3) 3 Tage bei Raumtemperatur verschlossen stehengelassen<sup>9)</sup>. Dann wurden 3 ccm Wasser zugefügt, zweimal mit 4 ccm *n*-Butanol ausgeschüttelt, die Butanolphase eingengt und der Rückstand wie üblich chromatographiert. Bis auf eine sehr geringe Spur war alles Ketal **3** in das Hemiketal **2** übergegangen. Es ist möglich, daß die bei einem wenig kleineren  $R_F$ -Wert als **3** (0.21 gegenüber 0.23) auftretende Substanz schon das  $\Delta^{22}$ -Produkt<sup>9)</sup> des Sarsaparillosids ist. Dieses kann sich bei der Kieselgelchromatographie aus **2** bzw. **3** gebildet haben und wurde auch gelegentlich bei der Dünnschichtchromatographie als ein weitgehend von **3** verdeckter schwacher Nebenfleck beobachtet.

Unter Verwendung der sauren Reaktionslösung erhält man ein identisches Chromatogramm wie bei der Chromatographie des Butanolextraktes.

**Hydrolysen:** Nebeneinander wurden je 10 mg der angereicherten *Saponine 2* und **3** in 5 ccm 3*N*  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mit 2.5 ccm Benzol überschichtet und 4 bis 5 Stdn. bei  $90^\circ$  Wasserbadtemperatur unter Rückfluß hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz dreimal mit 5 ccm Benzol ausgeschüttelt, die wäbr. Phase abgetrennt und diese so weit mit einem Rotationsverdampfer eingengt, bis die ca. 3 ccm wäbr. saure Lösung kein Benzol mehr enthielt. Diese wurde an Dowex 3 neutralisiert und zur Trockne eingedampft.

Man erhielt 9 bzw. 8 mg an Zuckergemischen, die bei der Papierchromatographie mit dem System A jeweils *L*-Rhamnose und eine größere Menge *D*-Glucose aufwiesen.

Zur Identifizierung des *Genins* wurden 400 mg der Mischfraktion von **2** und **3** mit 20 ccm 3*N*  $\text{HCl}$  und 20 ccm Benzol bei  $90^\circ$  unter Rückfluß 5 Stdn. lang erhitzt. Die Benzolphase wurde abgetrennt, die wäbr. Phase nochmals mit 20 ccm Benzol ausgezogen und beide Benzolphasen vereinigt. Sie wurden mit Wasser neutral gewaschen, die lipophile Phase über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet und eingedampft. Man erhielt 98 mg Rohgenin, das ca. 80% *Sarsapogenin* (**II**) enthält, wie sich durch dünnschichtchromatographischen Vergleich (Laufmittel: Benzol/Aceton (85:15)) mit authent. Material erwies. Auch die bei kleineren Hydrolyseansätzen von **2** bzw. **3** erhaltenen Geningemische hatten die gleiche Zusammensetzung. 45.2 mg des obigen Rohgenins wurden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie getrennt (Laufmittel: Benzol/Aceton (95:5), dreimalige Entwicklung). Es wurden 14 mg kristallines Material erhalten, das mit authent. *Sarsapogenin* identische IR-Spektren hatte und mit ihm keine Schmelzpunktsdepression aufwies. Schmp.  $199^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-75^\circ$  ( $c = 0.84$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

IR (in  $\text{CHCl}_3$ ): Banden bei 912 und 892/cm im Verhältnis von 3:1 sind charakteristisch für (25*S*)-Konfiguration<sup>24,25)</sup>.

Auch das nach Acetylierung mit *Acetanhydrid*/Pyridin erhaltene und mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (Benzol/Aceton 98.5:1.5) gereinigte *Acetat* besaß die in der Literatur beschriebenen Werte. Schmp. 142–144°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-71^\circ$  ( $c = 0.81$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

IR (in  $\text{CHCl}_3$ ): Charakteristische Banden bei 912, 892, 845, 1736, 1235 und 1263/cm.

*Enzymatische Spaltung von 2 und 3*: 93 mg **3** wurden mit 5 ccm Wasser und 1 ccm Schneckenenzym aus *Helix pomatia* ( $\beta$ -Glucosidase) 4 Tage bei Raumtemperatur hydrolysiert. Die n-Butanolextraktion lieferte 69 mg (entspr. 85% Ausb.) fast chromatographisch reines *Parillin* (**1**), während kein **3** und auch nicht Spuren von **2** mehr nachweisbar waren. Die wäßr. Phase enthielt als Zucker nur *D-Glucose*. Das erhaltene **1** wurde aus Methanol/Äthanol (1:1) umkristallisiert und zeigte die Werte der Literatur<sup>8)</sup>: Schmp. 216–221°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-63^\circ$  ( $c = 0.95$ , 80proz. Äthanol).

$\text{C}_{51}\text{H}_{84}\text{O}_{22} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1085.2) Ber. C 56.44 H 8.17 Gef. C 56.26 H 8.30

Beim Einsetzen von kleineren Mengen Saponingemisch (**2/3**  $\sim$  1:1) bzw. **2** erhielt man ebenfalls fast ausschließlich *Parillin* (**1**), während die gesamten Ausgangssubstanzen hydrolysiert worden waren.

*Charakterisierung von 2 und 3 in Form des  $\Delta^{20(22)}$ -Saponins (4)*: 2.95 g **2/3**-Gemisch wurden in 45 ccm Pyridin mit 30 ccm *Acetanhydrid* 22 Stdn. bei Raumtemperatur unter Rühren acetyliert. Zur Aufarbeitung setzte man 200 g Eis zu, ließ 30 Min. stehen, bis sich der ausgefallene Niederschlag zusammengeballt hatte. Er wurde abfiltriert, man löste ihn in Chloroform, wusch die Lösung einmal mit Wasser und dampfte sie zum Entfernen des Pyridins mehrmals mit Benzol i. Vak. zur Trockne ein. Man erhielt in 95proz. Ausb. 4.91 g *acetyliertes Saponin*.

4.9 g davon wurden in wasserfreiem *Eisessig* rückfließend unter Rühren 75 Min. auf 120° erhitzt. Dann wurde der *Eisessig* i. Vak. zunächst bei 70° und schließlich bei 90° abdestilliert und die verbleibende *Essigsäure* mit Benzol und Toluol azeotrop entfernt. Man erhielt ca. 4.9 g *peracetyliertes  $\Delta^{20(22)}$ -Produkt (14)*, das bei der Dünnschichtchromatographie mit Chloroform/Äthanol (97:3) den gleichen  $R_F$ -Wert (0.4) wie das acetylierte Saponin besitzt, sich jedoch in seiner tiefbraunen Anfärbung von der graugrünen des Acetates unterscheidet.

2.5 g **14** wurden zur Entacetylierung mit 30 ccm methanolischem *Ammoniak* (wasserfreies Methanol bei  $-10^\circ$  mit  $\text{NH}_3$  gesättigt) 10 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt; danach destillierte man das Methanol i. Vak. ab. Das als Nebenprodukt entstandene Acetamid war nur teilweise durch Digerieren mit *Essigester* aus dem  $\Delta^{20(22)}$ -Saponin-Produkt (**4**) herauszulösen. Nach mehrmaliger Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem System a konnte das Hauptprodukt von chromatographisch sich sehr ähnlich verhaltenden Verunreinigungen völlig befreit werden. Man erhielt 220 mg  $\Delta^{20(22)}$ -*Sarsaparillosid (4)*, die aus 90proz. Äthanol/Methanol (4:1) kristallisierten. Schmp. 173–175°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-36^\circ$  ( $c = 0.84$ , Methanol).

$\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{O}_{27} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1247.4) Ber. C 54.88 H 7.92 Gef. C 54.70 H 7.98

**4** zeigte keine Umwandlungserscheinungen bei der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie. Die saure *Hydrolyse* gab als Spaltprodukte *Sarsasapogenin*, *L-Rhamnose* und *D-Glucose*. Zur quantitativen Zuckerbestimmung<sup>10)</sup> wurden 30 mg **4**, wie beschrieben, mit methanol. HCl gespalten. Die erhaltenen Methylglykoside wurden in die Silylverbindungen übergeführt. Die gaschromatographische Bestimmung ergab bei Verwendung von aus *Parillin* und *Desgluco-parillin* gewonnenen empirischen Faktoren ein molares Zucker-verhältnis von *Rhamnose* : *Glucose* = 1 : 3.97.

*Methylierungen*: 29 mg **4** in 5 ccm wasserfreiem Dimethylsulfoxid wurden mit 200 mg Natriumhydrid (körnig von Fluka AG, Buchs)  $1\frac{1}{2}$  Stdn. bei Raumtemperatur unter Feuch-

tigkeitsausschluß gerührt<sup>12)</sup>. Dann wurden 3 ccm *Methyljodid* und nochmals 40 mg Natriumhydrid zugesetzt und 10 Stdn. bei Raumtemperatur, später bei 45° 1 Stde. unter Rückfluß gerührt.

Man nahm die Reaktionsphase in ca. 50 ccm Chloroform auf und ließ 20 Min. stehen. Dann wurde von der reichlich auskristallisierten anorganischen Substanz abgesaugt, die Lösung mit Chloroform gewaschen, auf 30 ccm eingengt und zur Entfernung des Dimethylsulfoxids zehnmal mit 30 ccm Wasser ausgeschüttelt. Man erhielt 30 mg eines schwach gelblichen Sirups, aus dem man nach Säulenchromatographie an 30 g Kieselgel (Laufmittel Benzol mit 6–9% Methanol) 19 mg nicht kristallisierendes, *permethyliertes*  $\Delta^{20(22)}$ -Saponin isolieren konnte.

15 mg davon wurden mit 3 ccm 5proz. *methanol. HCl* unter Feuchtigkeitsausschluß 5 Stdn. bei 70° hydrolysiert. Nach Zugabe von 6 ccm Wasser und Abdestillieren des Methanols wurde vom ausgefallenen Genin abfiltriert. Dieses besteht zu ca. 80% aus Sarsasapogenin. Die Lösung der Methylglykoside wurde auf 3 ccm eingengt, mit ca. 3 ccm 3*n* HCl versetzt und bei 105° Badtemperatur 3 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Neutralisation über Dowex 3 erhielt man ca. 6 mg Methylzucker. Neben geringen Spuren an Zersetzungsprodukten enthielt diese Probe drei mit Anilinphtalat anfärbbare Methylzucker. Durch Dünnschichtchromatographie mit den Systemen Benzol/Äther (3 : 2) und Benzol/Methanol (4 : 1) bzw. durch Papierchromatographie mit den Systemen A und B konnten durch Vergleich mit authent. Substanzen 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose (Hauptmenge), 3-Monomethyl-D-glucose und 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose identifiziert werden.

Nach *Kuhn* und Mitarbb.<sup>11)</sup> wurden 1.025 g 3 in 20 ccm DMF mit 4 g BaO (pulverisiert, Degussa), 160 mg pulverisiertem Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O (p.a., E. Merck) und 4 ccm *Methyljodid* versetzt. Unter Feuchtigkeitsausschluß ließ man 4 Tage bei 45° rühren. Pro Tag wurden 1.5 ccm Methyljodid, 60 mg Bariumhydroxid und 1 g BaO zugegeben, nach jedem zweiten Tag die doppelten Mengen. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsphase mit 250 ccm Chloroform aufgefüllt und 7 mal mit 200 ccm Wasser ausgeschüttelt, dann die vereinigten H<sub>2</sub>O-Phasen einmal mit Chloroform zurückgewaschen. Die braune Jodfärbung war beim zweiten Ausschütteln mit Thiosulfat entfernt worden. Das nach Abdestillieren des Chloroforms erhaltene Produkt (1.1 g) wies im IR (2-cm-Küvette/3 mg Substanz) noch OH-Banden auf. Deshalb wurde noch zweimal mit z.T. größeren Mengen an Reagenzien bis zum Verschwinden der OH-Bande nachmethyliert. Man erhielt 860 mg Methylierungsprodukt, aus dem bei Säulenchromatographie an 150 g Kieselgel (Benzol mit 0.3–1% Methanol) 623 mg vollmethyliertes Sarsaparillosid isoliert wurden. Dieses war nicht kristallin zu erhalten und zeigte bei der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie teilweise Umwandlung in eine polarere Substanz, die auch in den 860 mg des Methylierungsproduktes enthalten war. *Methyliertes Sarsaparillosid*:  $R_F$  0.34 (Benzol/Methanol 94 : 6);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-57^\circ$  ( $c = 0.57$ , CHCl<sub>3</sub>).

Aus 610 mg dieses Materials erhielt man nach üblicher methanolischer und anschließend wäbr. Hydrolyse 250 mg Methylzuckergemisch. Dieses wurde mit dem aus 4 erhaltenen Methylzuckergemisch dünnschicht- und papierchromatographisch verglichen. Da beide Gemische völlig übereinstimmende Eigenschaften aufwiesen, trennte man zur Identifizierung der Methylzucker die 250-mg-Mischung auf. Sie wurde, aufgezogen auf 1 g Kieselgel, auf eine Säule mit 40 g Kieselgel gebracht und mit Benzol, das steigende Mengen von 5–20% Aceton enthielt, eluiert. Man erhielt 130 mg 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose, 33 mg 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose und 30 mg 3-Monomethyl-D-glucose. Das entspricht einem Verhältnis von etwa 3 : 1 : 1. Die  $R_F$ -Werte bei Dünnschichtchromatographie mit dem System Benzol/Aceton (4 : 1) sind: 0.68, 0.76 und 0.20.

**2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose-anilid:** 30 mg des sirupösen *Rhamnosederivates* wurden in 2 ccm absol. Methanol mit 0.06 ccm *Anilin* (frisch dest. unter  $N_2$ ) und 2 mg  $NH_4Cl$  2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 5 ccm Wasser wurde das Methanol i. Vak. entfernt, 2mal mit 5 ccm Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformphase einmal mit Wasser rückgewaschen und eingengt. Der Rückstand (42 mg) wurde an 40 g Kieselgel mit Benzol/Äther (1:1) getrennt; man erhielt 20 mg *Anilid* vom Schmp. 122–124° (aus Petroläther). Die Kristalle zeigten bei der Dünnschichtchromatographie mit Benzol/Äther (2:3) einen Haupt- und einen Nebenfleck gelber Anfärbung ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Form des Anilids,  $R_F$ -Werte 0.57 und 0.34). Nach Misch-Schmp. und IR-Spektren identisch mit authent. Material. Schmp. 122–124°.

$C_{10}H_{23}NO_4$  (281.3) Ber. C 64.03 H 8.24 N 4.98 Gef. C 64.20 H 8.22 N 5.15

**2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose:** Schmp. 84–86° (mehrfach aus Petroläther (40–60°) umkristallisiert).  $[\alpha]_D^{20}$ : +86.5°  $\rightarrow$  +78° ( $c = 1.0$ ,  $H_2O$ ). Die Verbindung war nach IR-Spektrum, Misch-Schmp. und chromatographischem Verhalten identisch mit authent. Material.

$C_{10}H_{20}O_6$  (236.3) Ber. C 50.83 H 8.53 Gef. C 50.87 H 8.44

**3-Monomethyl-D-glucose:** Schmp. 161° (Methanol),  $[\alpha]_D^{20}$ : +92°  $\rightarrow$  +55° ( $c = 0.95$ ,  $H_2O$ ). Die Verbindung war nach IR-Spektrum, Misch-Schmp. und chromatographischem Verhalten identisch mit der nach *Schmidt* und *Simon*<sup>26)</sup> hergestellten Substanz.

$C_7H_{14}O_6$  (194.2) Ber. C 43.29 H 7.27 Gef. C 43.47 H 7.20

**Oxydativer Abbau<sup>15)</sup>:** Auf beschriebene Weise wurden 12 g an Sephadex G 25 gereinigtes Rohsaponin in das peracetylierte  $\Delta^{20(22)}$ -Produkt übergeführt. 9.6 g dieses noch farbstoffhaltigen Produktes wurden 2mal an 800 bzw. 790 g Kieselgel säulenchromatographisch mit dem System Chloroform mit 0.5 bis 1.5% Methanol getrennt. Als einheitliches Hauptprodukt erhielt man 2.3 g *acetyliertes  $\Delta^{20(22)}$ -Sarsaparillosid (14)*. Zu der Lösung von 2.08 g dieses Produktes und 445 mg Natriumacetat in 22.2 ccm Eisessig wurde bei 15° während 15 Min. eine Lösung von 895 mg  $CrO_3$  in 3.3 ccm 80proz. Essigsäure und 4.5 ccm Wasser getropft. Man ließ bei Raumtemperatur noch 1 Stde. rühren, zerstörte dann überschüss.  $CrO_3$  mit einigen ccm Methanol und setzte 65 ccm Wasser bis zur Trübung zu, anschließend wurde noch 1½ Stdn. gerührt. Dann wurde der Ansatz 4mal mit 200 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Man erhielt nach Verdampfen des Lösungsmittels 2.1 g Oxydationsprodukt. 1.95 g davon wurden in 52 ccm *tert.-Butylalkohol*<sup>27)</sup> mit 2.3 g *KOH* in 2.7 ccm Wasser unter  $N_2$  bei 30° während 3½ Stdn. unter Rühren hydrolysiert. Nach weiterem halbstg. Rühren bei Raumtemperatur wurden 40 ccm Wasser zugesetzt und der *tert.-Butylalkohol* i. Vak. abdestilliert. Durch 6maliges Ausschütteln mit 30 ccm *n*-Butanol erhielt man eine Butanol-Phase A und eine wäßr. Phase B, die folgendermaßen aufgearbeitet wurden:

**Butanol-Phase A:** Nach Verdampfen des Butanols i. Vak. wurden aus dem stark salzhaltigen Rückstand mit heißem Methanol 360 mg Roh-Pregnenolon-glykosid herausgelöst.

**$\Delta^{16}$ -Pregnenol-(3 $\beta$ )-on-(20)-glykosid (20):** Zweimalige Säulenchromatographie (System a; 80 bzw. 100 g Kieselgel) von 300 mg des Roh-Pregnenolon-glykosids lieferte 25 mg reines Pregnenolon-glykosid, das nach Hydrolyse mit 3*n* *HCl* und üblicher Aufarbeitung *D-Glucose* und *L-Rhamnose* lieferte. Dieses Glykosid (20) wies das für  $\Delta^{16}$ -Pregnenolone-(20) bekannte UV-Maximum bei  $\lambda_{max} = 239 m\mu$  auf. Es kristallisierte aus 90proz. Äthanol in nadeligen Büscheln. Schmp. 178–180°;  $[\alpha]_D^{20}$ : –22° ( $c = 0.75$ , Methanol).

$C_{45}H_{72}O_{21} \cdot 2H_2O$  (985.1) Ber. C 54.86 H 7.78 Gef. C 54.64 H 7.75

<sup>26)</sup> O. T. Schmidt und A. Simon, J. prakt. Chem. **152**, 190 (1939).

<sup>27)</sup> G. P. Mueller, R. E. Stobaugh und R. S. Winniford, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4888 (1953).

*A<sup>16</sup>-Pregnenol-(3 $\beta$ )-on-(20)-acetat (19)*: Zur Identifizierung des Aglykons wurden 80 mg des Roh-Pregnenolon-glykosids mit 4 ccm 4*n* HCl und 5 ccm Benzol 3 Stdn. auf 80° erhitzt. Man erhielt nach üblicher Aufarbeitung 30 mg Roh-Pregnenolon. Nach Acetylierung dieses Materials mit 4 ccm *Acetanhydrid*/Pyridin (1 : 1.5) und anschließender Trennung an 15 g Kieselgel mit dem System Benzol/Aceton (97 : 3) erhielt man chromatographisch einheitliches *A<sup>16</sup>-Pregnenol-(3 $\beta$ )-on-(20)-acetat*. Es erwies sich als identisch mit authent. Material, das aus Smilagenin gewonnen worden war.

IR (in CHCl<sub>3</sub>): 1735, 1660 (charakteristische Bande für  $\Delta^{16-20}$ -Ketone<sup>28</sup>); 958, 920, 895, 820/cm.

UV (in CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{\max} = 239 \text{ m}\mu$ ,  $\log \epsilon = 3.98$ .

Die *H<sub>2</sub>O-Phase B* wurde mit HCl auf pH 3 angesäuert, je zweimal mit *n*-Butanol und Chloroform extrahiert, die Lösung mit 2*n* NaOH neutralisiert und schließlich zur Trockne eingengt. Der sehr viel Salze enthaltende Rückstand wurde mit 90 ccm *Acetanhydrid*/Pyridin (4 : 5) bei Raumtemperatur 10 Stdn. acetyliert. Man goß den Ansatz in 200 ccm Eiswasser, ließ 1 Stde. stehen, filtrierte vom reichlich angefallenen blaßgelben Niederschlag (606 mg) ab und extrahierte das Filtrat mit Chloroform. Nach Einengen der Chloroform-Phase mit Benzol und Toluol bis zur Pyridinfreiheit erhielt man 230 mg *Säureglykosid-tetraacetat* als Rohprodukt. Der oben angefallene Niederschlag enthielt kein Säureglykosid wie eine Veresterung mit Diazomethan zeigte. Er stellte sich nach Entacetylierung mit NH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH als ein Glykosidgemisch heraus, das neben Pregnenolon-glykosid (Dünnschichtchromatographie mit System a, *R<sub>F</sub>*-Wert 0.24) in größeren Mengen **2** (*R<sub>F</sub>*-Wert 0.12) und noch zwei polarere Substanzen enthielt.

*$\delta$ -Hydroxy- $\gamma$ -methyl-valeriansäure-methylester-glycosid-tetraacetat (16)*: 230 mg des vorstehenden *Säureglykosid-tetraacetats* wurden in 3 ccm Methanol mit 20 ccm *Diazomethan*-Lösung (3proz. in Äther) 10 Min. stehengelassen. Überschüss. Diazomethan wurde danach mit 1/2 ccm Eisessig zerstört. Nach Einengen der Lösung erhielt man 235 mg eines rötlich-braunen Sirups, aus dem durch Trennung an 38 g Kieselgel beim Eluieren mit Petroläther (80–100°)/Aceton (5 : 1.7) 91 mg *Methylester 16* als hochviskoser Lack erhalten wurden. **16** wurde nicht kristallin erhalten; nach 7 Tagen i. Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-18^\circ$  ( $c = 1.108$ , CHCl<sub>3</sub>).

NMR (CDCl<sub>3</sub>): a) Protonen des Zuckerteils:  $\tau$  4.6–5.2 (m; 3 H an C-2, C-3, C-4); 5.47 (d,  $J = 7.5$  Hz; 1 H an C-1); 5.78 (m; 2 H an C-6);  $\sim 6.15$  (m; 1 H an C-5); 7.89; 7.93; 7.94; 7.96 (12 H von 4 Acetylgruppen).

b) Protonen des Säureteils:  $\tau$  6.26 (d;  $J = 5.5$  Hz) und  $\sim 6.7$  (m) beide von  $\delta$ -CH<sub>2</sub>; 7.64 (m;  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>); 7.8–8.8 (m;  $\gamma$ -CH,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>); 9.06 (d;  $J = 6$  Hz, CH<sub>3</sub> am  $\gamma$ -C); 6.3 (s; 3 H des Methylesters).

Massenspektrum: Gerät: MS 9 der A. E. I. mit Hochauflösung (12000); vgl. Abbild. S. 1259.

a) Peaks für Tetraacetylglucose<sup>16,17</sup>):  $m/e = 331, 243, 242, 200, 169, 157, 145, 141, 140, 115, 109, 103, 98$ .

b) Säureteil:  $m/e = 129$  (C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>, ber. 129.0915, gef. 129.0915) und  $m/e = 97$  (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O, ber. 97.0653, gef. 97.0653).

*$\delta$ -Hydroxy- $\gamma$ -methyl-valeriansäure-lacton (18)*: 63 mg **16** erhitze man mit 7 ccm 2proz. *methanol. KOH* 2 Stdn. unter Rückfluß und neutralisierte nach dem Abkühlen die Lösung an einer Kationenaustauscher-Säule. Nach dem Einengen zur Trockne erhielt man 40 mg Säureglucosid. Am Austauscher trat keine Spaltung des Glucosids ein, wie sich durch dünn-

<sup>28</sup>) R. N. Jones, P. Humphries und K. Dobriner, J. Amer. chem. Soc. **71**, 241 (1949).

schichtchromatogr. Vergleich ergab. Das *Säureglucosid* wurde in 4 ccm dest. Wasser mit 20 mg  $\beta$ -Glucosidase (Mandelermulin) versetzt und die Lösung über Nacht stehengelassen. Nach dem Einengen auf das halbe Vol. ließ sich in dieser Lösung *Glucose* dünnschichtchromatographisch mit dem System a bzw. papierchromatographisch mit dem System A nachweisen. Die enzymatische Spaltung verlief quantitativ: anschließend war kein Säureglucosid mehr nachweisbar. Die Extraktion der wäbr. Phase mit Äther brachte 15 mg ( $\gamma$ S)- $\gamma$ -Methyl- $\delta$ -valerolacton (**18**) als farbloses Öl,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-10^\circ$  ( $c = 0.47$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\tau$  7.70 (m; 2 H am  $\alpha$ -C); 6.00 (d;  $J = 5.5$  Hz) und 6.45 (d,  $J = 5.5$  Hz) (2 H am  $\delta$ -C); 9.05 (d;  $J = 5.5$  Hz; 3 H der  $\text{CH}_3$ -Gruppe); 7.8–8.8 (m; 3 H von  $\beta$ - $\text{CH}_2$  und  $\gamma$ -CH).

Massenspektrum:  $m/e = 114$  (21%)  $\text{M}^+$ ; 84 (30%); 70 (30%); 56 (100%); 55 (41%); 43 (21%); 42 (96%) und 41 (43%).

*Hydrierungen*: 500 mg **2** wurden in Methanol mit 250 mg Adams-Katalysator ( $\text{Pt}^{\text{IV}}$ -Oxid, Degussa-Hanau, 83.77% Pt) 16 Stdn. bei Raumtemperatur unter starkem Rühren und einem  $\text{H}_2$ -Druck von ca. 40 Torr hydriert. Da die Substanz z.T. ausfiel, wurde vom Platinoxid abfiltriert, mit viel Methanol gewaschen und das Filtrat auf ca. 50 ccm eingengt. Dann gab man 5 ccm Wasser zu und hydrierte unter den obigen Bedingungen nochmals 20 Stdn. Nach dem Abfiltrieren und Einengen zur Trockne wurde 3 Stdn. mit 20 ccm 3*n* HCl (6*n* HCl/Äthanol = 1:1) und 15 ccm Benzol bei 85° Badtemperatur hydrolysiert. Die Benzolphase wurde abgetrennt, einmal mit Wasser rückgewaschen und eingengt; die wäbr. saure Phase wurde 3mal mit Chloroform extrahiert, mit wenig Wasser rückgewaschen und ebenfalls eingengt. Nach der Dünnschichtchromatographie mit Benzol/Aceton (85:15) enthielt die Benzolphase zu ca. 80% *Dihydro-sarsasapogenin* (**12**) ( $R_F$ -Wert 0.3) neben wenig *Sarsasapogenin* (**11**) ( $R_F$ -Wert 0.6), während die Chloroformphase nur das Dihydrogenin **12** enthielt. Die vereinigten Rohgenine (130 mg) wurden an 50 g Kieselgel mit Benzol/Aceton (12:1) getrennt. Man erhielt 100 mg **12**, das aus Essigester kristallisierte. Es war identisch mit aus *Sarsasapogenin* gewonnenem *Dihydro-sarsasapogenin*. Schmp. 164–167°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-5^\circ$  ( $c = 0.75$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

*Dihydro-sarsasapogenin* (**12**) wurde als Vergleichssubstanz nach der in l.c.<sup>29)</sup> beschriebenen Methode gewonnen. Dazu wurden 250 mg *Sarsasapogenin* (**11**) in 300 ccm *Eisessig* in Gegenwart von 100 mg  $\text{PtO}_2$  bei Normaldruck und Raumtemperatur hydriert. Nach 1 Stde. hatte die Substanz 15 ccm  $\text{H}_2$  aufgenommen. Der Katalysator wurde abfiltriert, mit etwas *Eisessig* gewaschen und die Lösung eingengt. Das Hydrierungsprodukt trennte man an 40 g  $\text{SiO}_2$  mit Chloroform/Aceton (10:1). Man erhielt dünnschichtchromatographisch einheitlich 184.2 mg, die aus *Eisigester* umkristallisiert wurden. Schmp. 165–168°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-6.8^\circ$  ( $c = 0.6$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

Massenspektrum:  $m/e = 418$  (28.4%); 400 (6.5%); 344 (7.7%); 331 (70.0%); 313 (5.2%); 273 (100%); 255 (18.2%); 144 (82.0%).

*NaBH<sub>4</sub>-Reduktion der Saponine*: 4.5 g durch Sephadex-Trennung gewonnenes *Rohsaponin* wurden in 700 ccm Wasser über Nacht mit 1.5 g  $\text{NaBH}_4$  stehengelassen. Anschließend brachte man die Lösung mit konz. *Salzsäure* auf 3*n* HCl, überschichtete sie mit 400 ccm Benzol und erhitzte 5 Stdn. unter Rückfluß. Nach dem Abkühlen trennte man die Benzolschicht ab und schüttelte die wäbr. Lösung noch 3mal mit Chloroform aus. Die organischen Phasen wurden vereinigt, einmal mit Wasser rückgewaschen und eingengt (1.001 g). Dünnschichtchromatographisch ließen sich mit Benzol/Aceton (2:1) folgende Substanzen nachweisen:

<sup>29)</sup> I. Scheer, R. B. Kostic und E. Mosettig, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4871 (1953), und **77**, 641 (1955).

*Sarsasapogenin* ( $R_F$ -Wert 0.77); Substanz A (0.59); A' (0.57); *Dihydro-sarsasapogenin* (0.52); B' (0.50); Substanz C (0.45); C' (0.41); Substanz D (0.18); D' (0.14).

Das Gemisch wurde an 250 g  $\text{SiO}_2$  mit Benzol/Aceton (20:1) aufgetrennt. Dabei erhielt man 177 mg *Sarsasapogenin*, 22.5 mg Substanz A, 52.3 mg *Dihydro-sarsasapogenin*, 30.9 mg Substanz C und 193.9 mg Substanz D. Unter Berücksichtigung der Mischfraktionen entspricht das etwa 20% *Sarsasapogenin*, 4.5% A, 11% *Dihydro-sarsasapogenin*, 5.5% C und 25% D.

*Dihydro-sarsasapogenin* (12): Durch Kristallisation aus Essigester und nachfolgend aus Benzol erhält man Kristalle vom Schmp. 163–165°. Misch-Schmp. mit authent. (25*S*)-5 $\beta$ -Furostan-diol-(3 $\beta$ ,26) zeigte keine Depression.

NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 26- $\text{CH}_2$ ,  $\tau$  6.50 (d,  $J = 5$  Hz); 3 $\alpha$ -H, 5.85 (m); 16 $\beta$ -H, 6.65 (br. m); 22 $\alpha$ -H, 5.67 (br. m).

Massenspektrum:  $m/e = 418$  (25.9%); 400 (7.4%); 344 (7.3%); 331 (69.3%); 313 (4.8%); 273 (100%); 255 (17.4%); 144 (86.2%).

*Substanz C* kristallisierte aus Essigester mit Schmp. 104–108°.

NMR: 26- $\text{CH}_2$ ,  $\tau$  6.50 (d,  $J = 6$  Hz); 3 $\alpha$ -H, 5.85 (m);  $\sim 1-2$  H, 5.9–6.2 (m).

Massenspektrum:  $m/e = 418$  (0.5%); 416 (0.7%); 400 (0.6%); 388 (0.7%); 331 (13.7%); 313 (1.3%); 302 (3.1%); 287 (3.5%); 273 (100%); 255 (11.5%); 144 (81%).

[444/68]