

Rudolf Tschesche, Manfred Tauscher, Hans-Wolfram Fehlhaber und Günter Wulff

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

## Avenacosid A, ein bisdesmosidisches Steroidsaponin aus *Avena sativa*

Aus dem Institut für Organische und Biochemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 17. Dezember 1968)

Aus den Samen und Blättern des Hafers (*Avena sativa*) wurden zwei Steroidsaponine, Avenacosid A und B gewonnen, die als Aglykon beide Nuatigenin (1) enthalten. Die Struktur von Avenacosid A wurde durch stufenweisen enzymatischen Abbau, durch Hydrolyse des permethylierten Avenacosids A und massenspektrometrisch aufgeklärt. Danach hat Avenacosid A die Konstitution eines 3-O- $\{[\alpha\text{-L-Rhamnopyranosyl-(1\rightarrow4)]-[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)]-\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1)}\}$ -3 $\beta$ .26-dihydroxy-22.25-epoxy-(22S:25S)- $\Delta^5$ -furosten-26- $\beta$ -D-glucopyranosids (6).

Aus den Samen des gemeinen Hafers (*Avena sativa*) wurde bereits 1936<sup>2)</sup> ein Glykosidgemisch gewonnen, welches nach weiteren Untersuchungen<sup>3,4)</sup> als ein Gemisch dreier saponinartiger Glykoside erkannt<sup>5)</sup> wurde. Ihre Aglykone ordnete man<sup>5)</sup> der Spirostanol-Reihe zu, untersuchte sie jedoch nicht näher. 1964 wurde aus Wurzelspitzen von Haferkeimlingen ein Triterpensaponin, das Avenacin, isoliert und in seiner Struktur teilweise aufgeklärt<sup>6)</sup>. Zwei Jahre später gelang es in unserem Institut, die beiden Hauptsaponine aus den Hafersamen, die Avenacoside A und B, rein zu gewinnen<sup>7)</sup>. Als Aglykon liegt in beiden Glykosiden Nuatigenin (1)<sup>8)</sup> vor, welches sich während der sauren Hydrolyse zum Teil in das Isonuatigenin (2) umlagert<sup>7,8)</sup>. Die Zucker der beiden Avenacoside wurden papierchromatographisch als Glucose und Rhamnose ermittelt, und zwar für Avenacosid A im Verhältnis 3 : 1, für Avenacosid B im Verhältnis 4 : 1<sup>7)</sup>. — Im Hafer liegt also der seltene Fall vor, daß in einer Pflanze Triterpen- und Steroidsaponine nebeneinander vorkommen.

1) III. Mitteil.: R. Tschesche, B. T. Tjoa, G. Wulff und R. V. Noronha, Tetrahedron Letters [London] 1968, 5141.

2) F. Boas und R. Steuda, Angew. Bot. 18, 285 (1936).

3) W. Mohr, Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 49, 127 (1953).

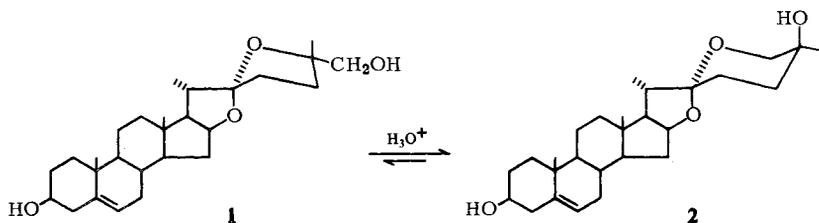
4) B. Hottenroth und W. Mohr, Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 52, 225 (1956).

5) M. Rohrlisch und G. Train, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 1954, 345.

6) J. V. Maizel, H. J. Burkhardt und K. H. Mitchell, Biochemistry 3, 424 (1964).

7) R. Tschesche und W. Schmidt, Z. Naturforsch. 21b, 896 (1966).

8) R. Tschesche und K. H. Richert, Tetrahedron [London] 20, 387 (1964).



Neben den Samen haben wir jetzt auch die Keimlingsblätter, ausgewachsene grüne Haferpflanzen und Haferstroh auf ihren Saponingehalt hin untersucht. Dazu wurde ein Methanol-Extrakt der Pflanzenteile zur Entfernung der Farbstoffe mit Petroläther extrahiert und anschließend mit n-Butanol ausgezogen. Aus diesem Auszug ließen sich beide Avenacoside durch mehrstufige Chromatographie an deaktiviertem Aluminiumoxid und Kieselgel isolieren. Beide Verbindungen waren chromatographisch einheitlich, jedoch nicht zur Kristallisation zu bringen. Die für die verschiedenen Pflanzenteile ermittelten Gehalte an beiden Saponinen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1. Saponingehalt in verschiedenen Teilen der Haferpflanze, bezogen auf die Trockensubstanz

Pflanzenteil	Gew.-Prozent	
	Avenacosid A	Avenacosid B
Samen	0.025	0.015
ausgewachsene grüne Pflanzen	0.3	1.3
Stroh	0.2	
Keimlingsblätter (10 – 12 Tage alt)	0.4	0.5

Um Einblick in die Zuckerverknüpfung im Avenacosid A zu gewinnen, wurde es nach *Kuhn*<sup>9)</sup> methyliert, das permethylierte Produkt durch Chromatographie gereinigt und anschließend einer salzsauren Hydrolyse unterworfen. Nach chromatographischer Trennung wurden so 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose, 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose und 3.6-Dimethyl-D-glucose im Molverhältnis 2:1:1 erhalten. Diese Zuckerderivate wurden in kristallisierter Form (die Trimethylrhamnose als Anilid) durch Vergleich mit authentischen Substanzen identifiziert.

Das Auftreten von 3.6-Dimethyl-glucose bedeutete, daß eine *verzweigte* Zuckerkette vorliegen muß. Von den drei an allen OH-Gruppen methylierten Zuckereinheiten müssen zwei mit der Dimethylglucose verknüpft gewesen sein, die dritte aber direkt mit dem Aglykon; Avenacosid A muß also *zwei* unabhängige Glykosidreste enthalten, die mit den OH-Funktionen an C-3 und C-26\*) des Nuatigenins (1) verbunden sind.

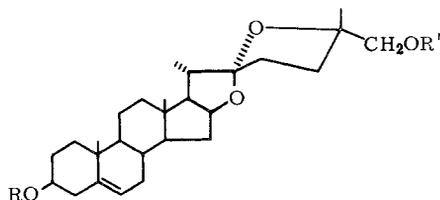
Mit einer spezifisch wirkenden  $\beta$ -Glucosidase (Präparat E. L. 12–63, Röhm & Haas) ließ sich eine der endständigen Glucose-Einheiten selektiv abspalten. Das so erhaltene Desgluco-avenacosid A wurde nach *Kuhn*<sup>9)</sup> methyliert. Eine nachfolgende saure

\*) Die Zuordnung der Position 26 für die CH<sub>2</sub>OH-Gruppe erfolgte nach der IUPAC-Nomenklaturregel 2S-1; vgl. Information Bulletin Nr. 33 der IUPAC vom Dezember 1968, S. 25.

<sup>9)</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).

Hydrolyse lieferte 2.3.6-Trimethyl-D-glucose, 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose und 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose. Anstelle der 3.6-Dimethyl-glucose, die bei der Hydrolyse des permethylierten Avenacosids A entstanden war, trat nun also 2.3.6-Trimethyl-glucose auf. Daraus folgt, daß die enzymatisch abgespaltene Glucose am C-2' der geninständigen, für die Verzweigung der Zuckerkette verantwortlichen Glucose-Einheit haften muß.

Zur weiteren Klärung der Zuckerverknüpfung wurde eine enzymatische Spaltung mit Hilfe einer  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus wentii* (Fraktion A)<sup>10</sup> durchgeführt. Dabei entstanden fünf Reaktionsprodukte, von denen zwei durch Chromatographie an Kieselgel abgetrennt werden konnten. Das unpolarste Spaltprodukt, welches nach einer Hydrolyse als Zucker nur Glucose lieferte, wurde mit Methyljodid und Natriumhydrid in Dimethylsulfoxid<sup>11</sup> methyliert. Für dieses Methylierungsprodukt ließ sich aus dem Massenspektrum (Abbild. 1) ableiten, daß es sich um permethyliertes Nuatigenin-26-glucosid handelt (**3**).



**3:** R = CH<sub>3</sub>, R' =  $\beta$ -Glu(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>

**4:** R = R' = COCH<sub>3</sub>

**5:** R = H, R' = CH<sub>3</sub>

Bei der Deutung des Massenspektrums von **3**, abgesichert durch Messungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie (s. Tab. 2 im Versuchsteil), zeigte sich, daß die Fragmentierung weitgehend analog ist zu der eines einfacheren Nuatigenin-Derivates, dem 3.26-Diacetat **4**. Dessen Massenspektrum (Abbild. 2) weist außer den für Steroidsapogenine dieses Typs zu erwartenden<sup>12</sup> Bruchstück-Ionen **a**–**d** zwei sehr intensive Peaks bei den Massenzahlen 184 und 185 auf. Diese Fragmente besitzen drei Sauerstoffatome (vgl. Tab. 2), müssen also – wie das Ion **d** – den Ring F und den Substituenten an C-26 enthalten; wir ordnen ihnen daher die Strukturen **e** und **f** zu. – Ohne auf die näheren Einzelheiten einzugehen sei erwähnt, daß die Fragmentierung des vom Isonuatigenin (**2**) abgeleiteten Diacetates in entscheidenden Punkten anders verläuft<sup>13</sup>.

Die Bruchstück-Ionen **a**–**f** treten nun – mit den entsprechenden Massenverschiebungen – auch beim Monoglucosid **3** auf. Da die Fragmente **d**, **e** und **f** die Glucose-Einheit enthalten, nicht aber das Ion **a** (sowie **b** und **c**), muß diese also am C-Atom 26 haften. Die intensiven Peaks im unteren Massenbereich des Spektrums, *m/e* 88, 101, 155 und 187, sind auf einige in diesem Zusammenhang unwesentliche, für Tetramethyl-glucoside typische Fragmente<sup>14</sup> zurückzuführen.

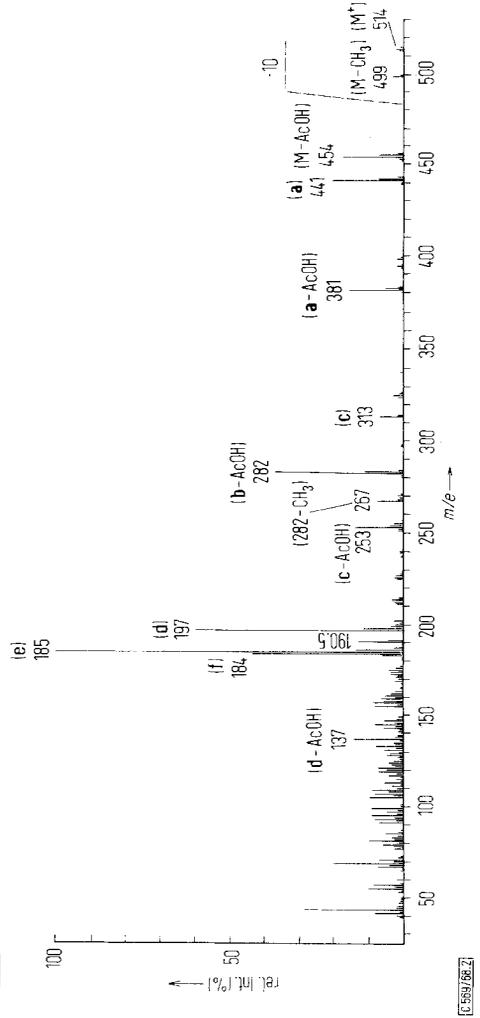
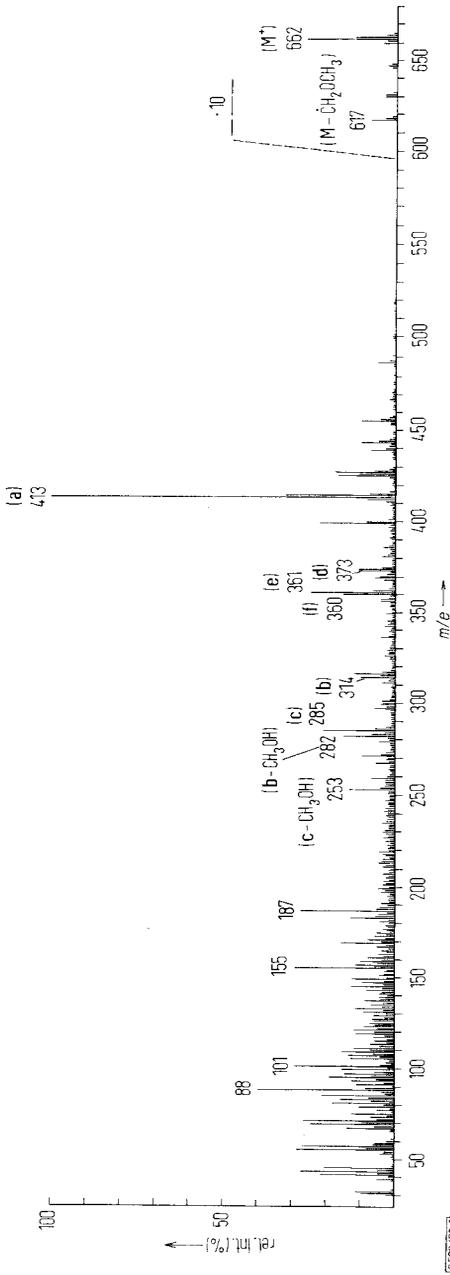
<sup>10</sup> G. Legler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 1359 (1967).

<sup>11</sup> D. M. W. Anderson und G. M. Cree, Carbohydrate Research **2**, 162 (1966).

<sup>12</sup> H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Vol. II, S. 110, Holden-Day, San Francisco 1964.

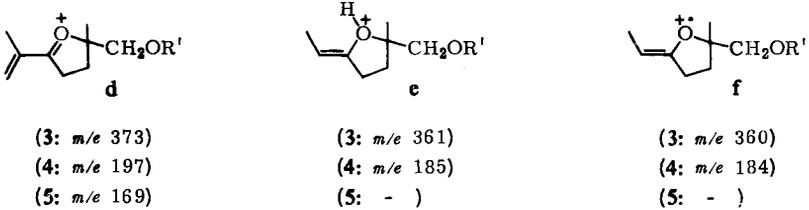
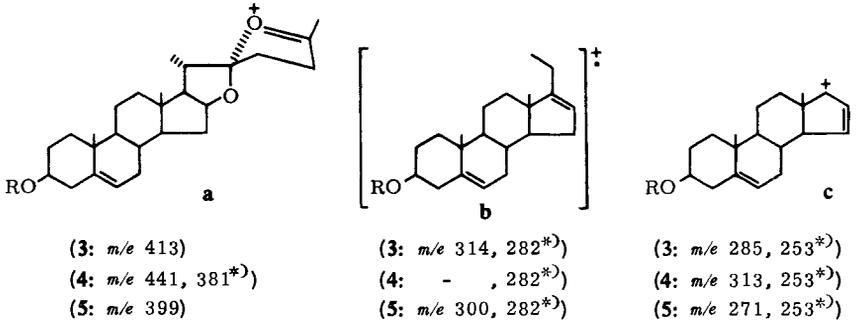
<sup>13</sup> H.-W. Fehlhaber, unveröffentlichte Arbeiten.

<sup>14</sup> Vgl. K. Heyns, H. F. Grützmacher, H. Scharmann und D. Müller, Fortschr. chem. Forsch. **5**, 448 (1966).



Abbild. 1 (oben). Massenspektrum des Nuatigenin-26-tetramethylglucosid-3-methyläthers (3)

Abbild. 2 (unten). Massenspektrum des Nuatigenin-diacetates (4)



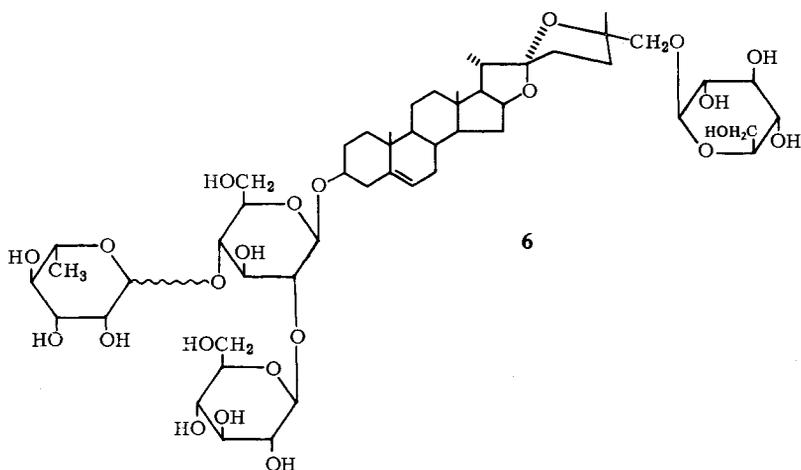
\*) Diese Massenzahl bezieht sich auf ein Fragment-Ion, bei dem zusätzlich der 3 $\beta$ -Substituent als ROH abgespalten wurde.

Die Glucose-Einheit in **3** läßt sich durch salzsaure Hydrolyse nur sehr schwer entfernen. Dieser Befund erklärt auch die Tatsache, daß bei der Hydrolyse des permethylierten Avenacosids A mit 5proz. methanolischer Salzsäure ein Nebenprodukt entstand, das nur wenig unpolarer als das Aglykon ist und bei einer Nachhydrolyse mit 10proz. methanolischer Salzsäure als Zucker ausschließlich 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose ergab.

Das zweite nach der Behandlung mit  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus wentii* isolierte Spaltprodukt lieferte nach Methylierung und anschließender Hydrolyse 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose, 3.6-Dimethyl-D-glucose und 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose. Die verzweigte Zuckerkette war bei dieser Spaltung also unversehrt geblieben. Neben den erwähnten Zuckern ließ sich im Hydrolysat ein Aglykon fassen, das im NMR-Spektrum bei  $\tau = 6.7$  das für eine OCH<sub>3</sub>-Gruppe zu erwartende Singulett lieferte. Das Massenspektrum zeigte ein Molekular-Ion bei *m/e* 444, dem nach hochauflösender Massenspektrometrie die Summenformel C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub> zukommt. Die beiden intensivsten Fragment-Peaks im Massenspektrum erschienen bei *m/e* 399 und 169; sie entsprechen der Abspaltung eines CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>-Radikals (Ion **a**) bzw. dem Bruchstück-Ion **d** (R' = CH<sub>3</sub>). Es handelte sich bei dieser Verbindung also um den Nuatigenin-26-methyläther (**5**). Daraus folgt, daß bei der vorausgegangenen Glykosidspaltung die Glucose-Einheit von C-26 entfernt worden war.

Aufgrund der beschriebenen Untersuchungen läßt sich zur Struktur des Avenacosids A folgendes aussagen: Als Aglykon liegt Nuatigenin (**1**) vor; dieses trägt an C-26 eine Glucose-Einheit und an C-3 eine verzweigte Zuckerkette, bestehend aus einer in 2'-Stellung durch Glucose und in 4'-Stellung durch die verbliebene Rhamnose-Einheit substituierten Glucose (**6**). Die drei Glucose-Einheiten sind, da sie von spezi-

fischen  $\beta$ -Glucosidasen<sup>15)</sup> abgespalten wurden,  $\beta$ -glykosidisch verknüpft. Die Konfiguration am C-Atom 1 der L-Rhamnose dagegen läßt sich nicht sicher zuordnen; da man jedoch bisher in der Natur in Glykosiden offenbar nur L-Rhamnoside mit  $\alpha$ -Konfiguration aufgefunden hat<sup>16)</sup>, darf man annehmen, daß auch beim Avenacosid A ein  $\alpha$ -L-Rhamnosid vorliegt.



Das Aglykon im Avenacosid A, Nuatigenin (1), läßt sich nach einer sauren Hydrolyse nicht eindeutig nachweisen, da es sich unter diesen Bedingungen bereits überwiegend in Isonuatigenin (2) umwandelt<sup>8)</sup>. Durch die massenspektrometrische Fragmentierung der an C-26 substituierten Verbindungen 3 und 5 ist allerdings das Vorliegen von Nuatigenin bewiesen worden. Außerdem ließ es sich chromatographisch — frei von Isonuatigenin (2) — nach einer enzymatischen Abspaltung beider Zuckerketten mittels einer Bakterienkultur<sup>17)</sup> nachweisen.

Die Strukturermittlung der Zuckerkette(n) im Avenacosid B ist noch nicht abgeschlossen und wird gegebenenfalls Inhalt einer späteren Mitteilung sein.

Avenacosid A stellt das dritte in seiner Struktur aufgeklärte bisdesmosidische Glykosid aus der Reihe der Steroidsaponine dar. Im Gegensatz zu Sarsaparillosid<sup>18)</sup> und Convallamarosid<sup>1)</sup> ist die Steroidseitenkette jedoch wegen der zusätzlichen Sauerstofffunktion an C-25 zu einem Spiroketal geschlossen. Die Eigenschaften der Verbindung sind dennoch analog denen der anderen beiden Saponine: Auch Avenacosid A zeigt nur geringfügige Hämolyse und die antibiotischen Eigenschaften sind wenig ausgeprägt. Bemerkenswerterweise weist aber das 26-Desgluco-avenacosid A, im Gegensatz zu den 26-Desgluco-Derivaten des Sarsaparillosids<sup>18)</sup> und des Convallamarosids<sup>1)</sup>, ebenfalls nur schwach ausgeprägte hämolytische und antibiotische Wirksamkeit auf.

<sup>15)</sup> Das Präparat aus *Aspergillus wentii* war frei von  $\alpha$ -Glucosidasen; G. Legler, persönl. Mitteilung.

<sup>16)</sup> Vgl. z. B. W. Klyne, Biochem. J. **47**, XLI (1950).

<sup>17)</sup> Wir danken Herrn Priv.-Doz. Dr. F. Schönbeck (Institut für Pflanzenkrankheiten der Univ. Bonn) für die Inkubation unseres Avenacosids A mit einem von ihm isolierten, noch unbekanntem Erdbakterienstamm.

<sup>18)</sup> R. Tschesche, G. Lüdke und G. Wulff, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 2785; Chem. Ber. **102**, 1253 (1969).

Von Interesse ist das Vorkommen dieser Saponine in Lebensmitteln, da die aus den Samen hergestellten Haferflocken und anderen Verarbeitungsprodukte eine wesentliche Rolle in der Kinderernährung spielen. Pharmakologische Untersuchungen an den isolierten Verbindungen wurden allerdings bisher noch nicht durchgeführt. Beide Avenacoside besitzen einen bitteren Geschmack, Avenacosid B stärker als Avenacosid A.

Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Legler danken wir sehr für die Überlassung der Enzympräparate sowie für wertvolle Ratschläge, Frau U. Lander und Herrn H. Rindermann für geschickte Mitarbeit bei der Erstellung der massenspektrometrischen Daten. Der *Stiftung Volkswagenwerk* danken wir für die zur Anschaffung der Massenspektrometer bereitgestellten Mittel und dem *Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten von Nordrhein-Westfalen* für Sachmittel.

### Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskop-Heiztisch nach *Weygand*, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Die IR-Spektren wurden mit dem Perkin-Elmer-Spektrophotometer, Modell 221 mit Gitter-Prismen-Austauscheinheit, aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden mit dem Varian A-60 gemessen. Die Massenspektren wurden mit dem CH 4 (M. A. T.) im Direkt-Einlaß-Verfahren bei einer Elektronenenergie von 70 eV und einer Ionenquellentemperatur von ca. 70° aufgenommen. Zur exakten Massenbestimmung (s. Tab. 2) arbeitete man mit dem MS 9 (A. E. I.) bei einem Auflösungsvermögen von etwa 11000. Die Elementaranalysen wurden von der Analytischen Abteilung unseres Instituts und von dem Mikrochemischen Laboratorium Dr. *Pascher*, Bonn, ausgeführt.

Tab. 2. Durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelte Summenformeln für Molekular- und Fragment-Ionen

Verbindung	Ion	Summenformel	Ber. Masse	Gef. Masse	Abweichung in mmu *)
3	M <sup>+</sup>	C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	662.4394	662.4385	-0.9
	M-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>57</sub> O <sub>8</sub>	617.4054	617.4054	-
	a	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> O <sub>3</sub>	413.3056	413.3055	-0.1
	b	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O	314.2610	314.2608	-0.2
	b-CH <sub>3</sub> OH	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub>	282.2347	282.2344	-0.3
	c	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O	285.2218	285.2206	-1.2
	c-CH <sub>3</sub> OH	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub>	253.1956	253.1942	-1.4
	d	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> O <sub>7</sub>	373.2226	373.2222	-0.4
	e	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>7</sub>	361.2226	361.2220	-0.6
	f	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	360.2148	360.2139	-0.9
	m/e 187	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	187.0970	187.0965	-0.5
m/e 155	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	155.0708	155.0704	-0.4	
m/e 101	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	101.0603	101.0600	-0.3	
m/e 88	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88.0524	88.0522	-0.2	
4	e	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub>	185.1178	185.1177	-0.1
	f	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	184.1099	184.1101	+0.2
5	M <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	444.3239	444.3221	-1.8
	a	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> O <sub>3</sub>	399.2899	399.2885	-1.4
	d	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	169.1228	169.1225	-0.3

\*) = 10<sup>-3</sup> Masseneinheiten.

Die Dünnschicht-Chromatographie (DC) an Kieselgel G (Merck) wurde wie üblich durchgeführt<sup>19)</sup>. Angefärbt wurde mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1 : 2) oder mit Anilinphthalat in Isobutylalkohol<sup>20)</sup>. Zur Papierchromatographie (absteigend) wurde das Papier 2043 b (Schleicher & Schüll) verwendet. Zur Säulenchromatographie benutzte man Kieselgel (Gebr. Herrmann, Köln) bzw. Aluminiumoxid neutral (Merck, Darmstadt).

Fließmittelsysteme für Säulen- und Dünnschichtchromatographie:

A) Chloroform/Methanol/Wasser 65 : 35 : 10<sup>21)</sup>

B) Chloroform/Methanol/Wasser 65 : 70 : 35

C) Chloroform/Methanol/Wasser 30 : 70 : 35

D) Benzol/Aceton 30 : 9

E) Benzol/Methanol 10 : 1

F) Chloroform/Methanol 10 : 1

Fließmittelsysteme für Papierchromatographie:

G) n-Butanol/Wasser/CCl<sub>4</sub> 4 : 4 : 3<sup>22)</sup>

H) n-Butanol/Butanon-(2) 1 : 1; gesättigt mit Boratpuffer vom pH 8.94<sup>23)</sup>

I) Pyridin/Eisessig/Essigester/Wasser 5 : 1 : 5 : 3<sup>24)</sup>

K) Butanon-(2), gesättigt mit NH<sub>3</sub> aqu. (2proz.)<sup>25)</sup>

L) Benzol/Äthanol/Wasser/NH<sub>3</sub> aqu. (25proz.) 200 : 47 : 14 : 1<sup>26)</sup>

*Isolierung von Avenacosid A (6) und Avenacosid B:* Die einzelnen Teile der Haferpflanze wurden in Mengen von je 5–8 kg mit etwa der dreifachen Menge Methanol versetzt, mit einem Ultraturax fein zerkleinert und viermal mit je 30 l Methanol extrahiert. Der Methanolextrakt wurde bis zur sirupösen Konsistenz eingedampft. Je 100 g davon nahm man mit 2.5 l Wasser auf und schüttelte zur Entfernung der Pflanzenfarbstoffe viermal mit je 750 ccm Petroläther (60–95°) aus. Die wäßrige Phase wurde anschließend viermal mit je 500 ccm n-Butanol ausgezogen. Der Butanolextrakt wurde zur Abtrennung der restlichen Farbstoffe an der 200fachen Menge Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe IV im System C chromatographiert. Die Trennung der Avenacoside gelang durch Chromatographie an der 200fachen Menge Kieselgel im System B. — Zur Darstellung einer größeren Menge Avenacosid A wurde der in analoger Weise erhaltene methanolische Extrakt<sup>27)</sup> (4 kg) aus 100 kg fein zerquetschten Haferkörnern nach dem gleichen Verfahren aufgearbeitet. Aus dieser Menge ließen sich 15 g Avenacosid A und 8 g Avenacosid B gewinnen. Die physikalischen Daten beider Glykoside sind in l. c.<sup>7)</sup> bereits angegeben.

*Methylierung von Avenacosid A:* 1.95 g Avenacosid A wurden in 40 ccm Dimethylformamid mit 330 mg Ba(OH)<sub>2</sub>, 8 g BaO und 8 ccm Methyljodid versetzt und 6 Stdn. bei Raumtempe-

<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).

<sup>21)</sup> T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **11**, 1546 (1963).

<sup>22)</sup> R. Tschesche und G. Wulff, Tetrahedron [London] **19**, 621 (1963).

<sup>23)</sup> M. T. Krauss, H. Jäger, O. Schindler und T. Reichstein, J. Chromatogr. [Amsterdam] **3**, 63 (1960).

<sup>24)</sup> F. G. Fischer und H. Dörfel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **301**, 224 (1955).

<sup>25)</sup> F. C. Williams und J. K. N. Jones, Canad. J. Chem. **45**, 275 (1966).

<sup>26)</sup> H. C. Srivastava und G. Adams, Canad. J. Chem. **40**, 1415 (1962).

<sup>27)</sup> Die erschöpfende Extraktion mit Methanol bei Raumtemperatur und anschließende

ratur gerührt. Dann erwärmte man im Wasserbad auf 40° und beließ die Reaktionsmischung unter stetem Rühren bei dieser Temperatur, wobei täglich 200 mg BaO und 2 ccm Methyljodid hinzugefügt wurden. Nach 10 Tagen war ein dünnschichtchromatographisch einheitliches Produkt entstanden. Man verdünnte mit 500 ccm Chloroform, filtrierte vom BaO ab und wusch neunmal mit Wasser. Zur Entfernung des Jods wurde eine Spatelspitze Natriumthiosulfat hinzugefügt. Nach Einengen der Chloroformphase erhielt man 3.4 g eines dunkelbraunen Öls, welches an 500 g Kieselgel im System E chromatographiert wurde. Man erhielt 970 mg reines *permethyliertes Avenacosid A*, welches im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr zeigte.

*Hydrolyse des permethylierten Avenacosids A*: 970 mg des obigen Methylierungsproduktes wurden mit 30 ccm 5proz. methanolischer HCl 15 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde mit 30 ccm Wasser verdünnt, das Methanol i. Vak. abdestilliert und vom Niederschlag abfiltriert. Dieser enthielt 549 mg eines Gemisches aus *Nuatigenin (1)* und *Isonuatigenin (2)*. Das Filtrat wurde i. Vak. auf 20 ccm eingeeengt, mit 20 ccm 2*n* HCl versetzt und zur Hydrolyse der Methylglykoside 15 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Danach waren dünnschichtchromatographisch im System D drei mit Anilinchthalat anfärbbare methylierte Zucker nachzuweisen. Die Säure wurde über Ionenaustauscher (Dowex 3, OH-Form) entfernt und die Lösung i. Vak. eingedampft. Das resultierende Zuckergemisch (396 mg) wurde an 50 g Kieselgel (71–90  $\mu$ ) chromatographiert. Man eluierte mit Benzol und Benzol/Aceton-Gemischen (30:1, 30:2, 30:4, 30:8, 30:16) und erhielt so 135 mg *2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose*, 67 mg *2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose* und 68 mg *3.6-Dimethyl-D-glucose*. Ihre  $R_F$ -Werte im Dünnschicht-Chromatogramm im System D liegen bei 0.45, 0.65 bzw. 0.20. Die Identifizierung dieser Zucker geschah folgendermaßen:

*2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose als Anilid*: Der erhaltene Sirup von *2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose* wurde in 4 ccm absol. Methanol mit 0.08 ccm Anilin und 4 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Verdünnen mit Wasser wurde dreimal mit je 200 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Der i. Vak. zur Trockne gebrachte Chloroformauszug wurde an 40 g Kieselgel chromatographiert. Elution mit Benzol/Aceton (10:1) lieferte 58 mg Anilid vom Schmp. 123–125° (aus Äther/Petroläther). Nach Mischprobe,  $R_F$ -Wert und IR-Spektrum war die Verbindung identisch mit authent. Material.

$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_4$  (281.3) Ber. C 64.03 H 8.24 N 4.98 Gef. C 64.27 H 8.37 N 5.45

*2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose*: Schmp. 92–94° (aus Petroläther);  $[\alpha]_D^{20}$ : +77.8° (Enddrehung;  $c = 1.06$ , Wasser); nach Mischprobe, IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten identisch mit authent. Produkt.

$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_6$  (236.3) Ber. C 50.83 H 8.53 Gef. C 50.97 H 8.65

*3.6-Dimethyl-D-glucose*: Schmp. 112–117° (aus Essigester);  $[\alpha]_D^{20}$ : +60.9° (Enddrehung;  $c = 1.08$ , Wasser); nach Mischprobe, IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten identisch mit authent. Material. Durch Papierchromatographie in den Systemen G, H und K ( $R_F$ -Werte 0.16, 0.47 und 0.17) konnten alle anderen Dimethylglucosen ausgeschlossen werden.

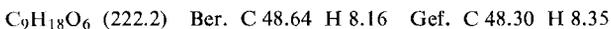
$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_6$  (208.2) Ber. C 46.15 H 7.75 Gef. C 46.06 H 7.73

*Enzymatische Spaltung mit E. L. 12–63 (Röhm & Haas)*: 3.99 g *Avenacosid A* wurden in 600 ccm verd. Salzsäure (pH 4) mit einer Lösung von 3.27 g *Enzym* in 600 ccm verd. Salzsäure (pH 4) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde gut geschüttelt und drei Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Zur Ausflockung des Enzyms wurden 900 ccm Aceton zugegeben und 10 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abfiltrieren des Enzyms und Abdestillieren des Acetons wurde die wäßrige Lösung viermal mit je 400 ccm *n*-Butanol ausgeschüttelt. Der Butanol-

Extrakt wurde an 450 g Kieselgel im System A chromatographiert. Es wurden so 2,27 g 2'-Desgluco-avenacosid A erhalten. In der wäßrigen Phase der Butanol-Extraktion ließ sich papierchromatographisch im System I nur *Glucose* nachweisen.

*Methylierung und Hydrolyse des 2'-Desgluco-avenacosids A*: Das obige Material (2,27 g) wurde, wie beim Avenacosid A beschrieben, methyliert und aufgearbeitet. Das Reaktionsgemisch (2,3 g) wurde an 450 g Kieselgel mit Benzol und Benzol/Aceton-Gemischen (30 : 1, 30 : 2, 30 : 4, 30 : 8, 30 : 16) chromatographiert. Man erhielt so 1,54 g Permethylierungsprodukt, das im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr aufwies. Nach einer Hydrolyse mit 5proz. methanolischer HCl und Verjagen des Methanols i. Vak. wurde das Aglykon durch Filtration abgetrennt (587 mg einer Mischung aus *Nuatigenin* (1) und *Isonuatigenin* (2)) und mit 15 ccm 2*n* HCl nachhydrolysiert. Nach Neutralisieren am Ionenaustauscher erhielt man 218 mg 2,3,4-Trimethyl-L-rhamnose, 150 mg 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose und 176 mg 2,3,6-Trimethyl-D-glucose, deren Identifizierung folgendermaßen geschah:

2,3,6-Trimethyl-D-glucose: Schmp. 118–121° (lange Nadeln aus Äther/Petroläther);  $[\alpha]_D^{20}$ : +71,5° (Enddrehung;  $c = 1,04$ , H<sub>2</sub>O). Nach Mischprobe, IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten identisch mit authent. Material. Durch Papierchromatographie im dem System L konnten die anderen Trimethylglucosen ausgeschieden werden. Die 2,3,6-Trimethyl-glucose hatte hier den  $R_F$ -Wert 0,23.



*Enzymatische Spaltung mit  $\beta$ -Glucosidase aus Aspergillus wentii*: Zur Lösung von 5 g *Avenacosid A* in 120 ccm verd. Salzsäure (pH 4) wurden 150 ccm einer verd. Enzym-Lösung<sup>10)</sup> vom pH 4 gegeben und das Reaktionsgemisch 4 Stdn. bei Raumtemperatur stengelassen. Nach dieser Zeit ließen sich dünnschichtchromatographisch (System B, auf Kieselgel) fünf Spaltprodukte mit den  $R_F$ -Werten 0,25, 0,3, 0,5, 0,55 und 0,85 nachweisen. Das Enzym wurde durch Zufügen von 200 ccm Methanol und 1/2stdg. Kochen unter Rückfluß ausgeflockt. Nach dem Abfiltrieren und Abdestillieren des Methanols wurde die wäßrige Phase viermal mit je 400 ccm *n*-Butanol ausgeschüttelt. Der Butanol-Extrakt wurde an 450 g Kieselgel chromatographiert:

a) Mit Chloroform/Methanol (20 : 4) eluierte man 424 mg *Nuatigenin-26-D-glucosid* ( $R_F = 0,85$  im System B). Nach einer Hydrolyse mit 5proz. methanolischer HCl entstanden *Nuatigenin* und *Isonuatigenin* neben *Glucose*, wie durch Papierchromatographie im System I nachgewiesen werden konnte.

b) Mit Chloroform/Methanol (20 : 8) wurden 719 mg einer Mischfraktion ( $R_F$ -Wert = 0,5 und 0,55 im DC-System B) aufgefangen.

c) Mit dem System A eluierte man dann 370 mg 26-Desgluco-avenacosid A.

*Nuatigenin-26-[tetramethyl-D-glucosid]-3-methyläther* (3): 100 mg *Nuatigenin-26-D-glucosid* wurden in 6 ccm Dimethylsulfoxid mit 0,3 g NaH und 1,5 ccm *CH<sub>3</sub>J* versetzt und 2 Stdn. bei Raumtemperatur und weitere 24 Stdn. bei 40° gerührt. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man 217 mg eines gelben Öls, aus dem durch Chromatographie an 50 g Kieselgel mit Benzol/Aceton (30 : 4) 64 mg 3 abgetrennt werden konnten. Es zeigte im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr. Die Summenformel wurde massenspektrometrisch zu C<sub>38</sub>H<sub>62</sub>O<sub>9</sub> ermittelt (s. Tab. 2).

*Hydrolyse von 3*: 10 mg 3 wurden mit 2 ccm 5proz. methanolischer HCl unter Rückfluß gekocht. Die dabei entstandenen Aglykone — *Nuatigenin*- und *Isonuatigenin*-3-methyläther — waren wesentlich unpolarer als *Nuatigenin* und *Isonuatigenin*, wie sich dünnschichtchromatographisch im System E nachweisen ließ. Als Zuckerkomponente ließ sich nach Hydrolyse des Methylglykosids mit wäßriger HCl nur 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose im System G papierchromatographisch nachweisen.

*Methylierung und Hydrolyse von 26-Desgluco-avenacosid A*: 370 mg 26-Desgluco-avenacosid A wurden in 22 ccm Dimethylsulfoxid mit 1 g NaH und 4 ccm CH<sub>3</sub>J versetzt und 2 Stdn. bei Raumtemperatur und anschließend 24 Stdn. bei 40° gerührt. Nach Aufarbeitung wurden 582 mg eines gelben Öles erhalten, welches im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr zeigte. Dieses Material wurde mit 50 ccm 5proz. methanolischer HCl hydrolysiert. Nach Verdünnen mit 50 ccm Wasser und Abdestillieren des Methanols wurden 129 mg Aglykongemisch abfiltriert, das an zwei präparativen Dünnschichtplatten (20 × 20 cm, 15 g Kieselgel mit Fluoreszenz-Indikator P<sub>2</sub><sup>28)</sup>) aufgetrennt wurde. Es ließen sich durch Elution mit Aceton 39 mg *Nuatigenin-26-methyläther* (5) vom Schmp. 179° (aus Äther) gewinnen. Die Summenformel wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie zu C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub> bestimmt (s. Tab. 2). Die wäßrig-salzsaurer Nachhydrolyse der Methylglykoside ergab 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose, 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose und 3.6-Dimethyl-D-glucose (papierchromatographisch nachgewiesen im System G).

<sup>28)</sup> R. Tschesche, G. Biernoth und G. Wulff, J. Chromatogr. [Amsterdam] **12**, 342 (1963).