

Rudolf Tschesche und Peter Lauven

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

## Avenacosid B, ein zweites bisdesmosidisches Steroidsaponin aus *Avena sativa*

Aus dem Institut für Organische und Biochemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 20. Juli 1971)

Die Struktur von Avenacosid B wurde durch stufenweisen enzymatischen Abbau, durch Hydrolyse des permethylierten Glykosids und mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt. Danach hat es den Aufbau eines 3-O- $\{[\alpha\text{-L-Rhamnopyranosyl-(1\rightarrow4)]-[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow3)]-\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)]-\beta\text{-D-glucopyranosyl}\}$ -3 $\beta$ .26-dihydroxy-22.25-epoxy-(22S : 25S)- $\Delta^5$ -furosten-26- $\beta$ -D-glucopyranosid (5).

**Steroid Saponines Containing more than one Sugar Chain, V<sup>1)</sup>**

**Avenacoside B, a Second Bisdesmosidical Steroid Saponine from *Avena Sativa***

The structure of avenacoside B was determined by stepwise enzymatic degradation, by hydrolysis of the permethylated glycoside and with the help of mass spectrometry. It has the constitution 3-O- $\{[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow4)]-[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow3)]-\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)]-\beta\text{-D-glucopyranosyl}\}$ -3 $\beta$ .26-dihydroxy-22.25-epoxy-(22S : 25S)- $\Delta^5$ -furostene-26- $\beta$ -D-glucopyranosid (5).

1966 war es uns gelungen, die beiden Hauptsaponine aus Hafersamen, die Avenacoside A und B, rein zu gewinnen<sup>2)</sup>; Aglykon ist in beiden Glykosiden Nuatigenin (1)<sup>3)</sup>, das sich während der sauren Hydrolyse zum Teil in Isonuatigenin (2) umlagert<sup>2,3)</sup>. Die Zucker der beiden Avenacoside wurden papierchromatographisch als Glucose und Rhamnose ermittelt. Ihre quantitative Bestimmung erfolgte gaschromatographisch mittels der silylierten Methylglykoside<sup>4)</sup>. Für das Avenacosid A ergab sich ein Verhältnis Glucose/Rhamnose von 3 : 1, für das Avenacosid B von 4 : 1<sup>2)</sup>. 1969 war bereits über die Konstitution des Avenacosids A berichtet worden<sup>1)</sup>.

Um Einblick über die Zuckerverknüpfung des Avenacosids B zu erhalten, wurde es mit Methyljodid und Natriumhydrid in Dimethylsulfoxid methyliert<sup>5)</sup> und anschließend einer salzsauren Hydrolyse unterworfen. Nach chromatographischer Trennung der Methylzucker wurden 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose, 2.3.4.6-Tetramethyl-D-

<sup>1)</sup> IV. Mitteil.: R. Tschesche, M. Tauscher, H.-W. Fehlhaber und G. Wulff, Chem. Ber. 102, 2072 (1969).

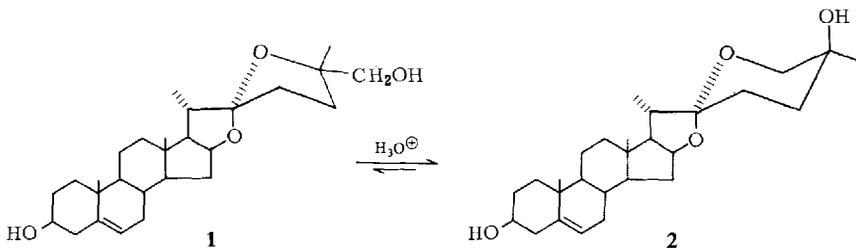
<sup>2)</sup> R. Tschesche und W. Schmidt, Z. Naturforsch. 21b, 896 (1966).

<sup>3)</sup> R. Tschesche und K. H. Richert, Tetrahedron [London] 20, 387 (1964).

<sup>4)</sup> G. Wulff, J. Chromatogr. [Amsterdam] 18, 285 (1965).

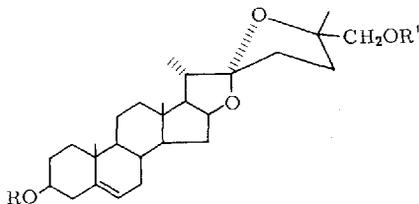
<sup>5)</sup> D. M. W. Anderson und G. M. Cree, Carbohydrate Res. [Amsterdam] 2, 162 (1966).

glucose, 2.4.6-Trimethyl-D-glucose und 3.6-Dimethyl-D-glucose im Molverhältnis 1 : 2 : 1 : 1 isoliert. Diese Zucker wurden in kristallisierter Form (die Trimethyl-rhamnose als Anilid) durch Vergleich mit authentischen Präparaten identifiziert.



Das Auftreten der 3.6-Dimethyl-D-glucose weist darauf hin, daß im Avenacosid B eine verzweigte Zuckerkette vorliegen muß. Da drei an allen alkoholischen OH-Gruppen methylierte Zuckereinheiten isoliert wurden, muß das Saponin *zwei* unabhängige Glykosidreste enthalten, die mit den OH-Funktionen an C-3 und C-26 des Nuatigenins (1) verbunden sind.

Der weiteren Klärung der Zuckerverknüpfung diente eine enzymatische Spaltung mit einer spezifisch wirkenden  $\beta$ -Glucosidase (Präparat E. L. 27-67, Röhm & Haas, Darmstadt). Dabei entstanden sieben dünn-schichtchromatographisch nachweisbare Spaltprodukte, von denen zwei nach chromatographischer Reinigung untersucht wurden. Das erste, weniger polare Spaltprodukt liefert nach Hydrolyse als Zucker nur Glucose. Nach Methylierung mit Methyljodid und Natriumhydrid in Dimethylsulfoxid<sup>5)</sup> ließ sich aus dem Massenspektrum ableiten, daß es sich hierbei um permethyliertes Nuatigenin-26-glucosid (3) handelte<sup>1)</sup>.



|   | R               | R'  |
|---|-----------------|---|
| 3 | CH <sub>3</sub> | $\beta$ -Glu(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> |
| 4 | H               | CH <sub>3</sub>                             |

Das zweite nach der Spaltung mit der  $\beta$ -Glucosidase E. L. 27-67 isolierte Derivat lieferte nach Methylierung und anschließender Hydrolyse 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose, 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose, 2.4.6-Trimethyl-D-glucose und 3.6-Dimethyl-D-glucose. Die verzweigte Zuckerkette war also unversehrt geblieben. Als Aglykon wurde im Hydrolysat eine Verbindung erhalten, deren Massenspektrum mit dem des Nuatigenin-26-methyläthers (4) identisch war<sup>1)</sup>. Daraus folgt, daß die Zuckerkette an C-26 des Aglykons nur aus einer  $\beta$ -glykosidisch verknüpften Glucose besteht.

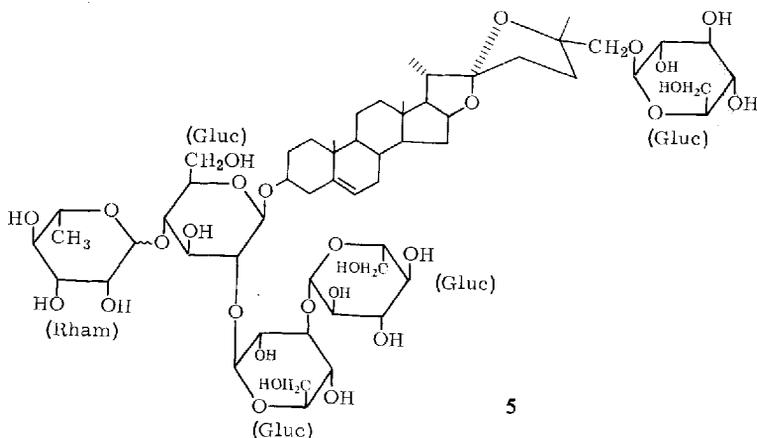
Um die Zuckerverknüpfung der verzweigten Zuckerkette an C-3 des Nuatigenins zu klären, wurde Avenacosid B mit einer etwas anders wirkenden  $\beta$ -Glucosidase (Präparat E. L. 12-63, Röhm & Haas) gespalten. Es ließen sich zwei Produkte isolieren, die wenig unpolare waren als das Ausgangsprodukt. Sie waren chromatographisch identisch mit Avenacosid A und Desgluco-avenacosid A, das aus der Spaltung des Saponins A mit der gleichen  $\beta$ -Glucosidase entstand<sup>1)</sup>.

Die beiden Spaltprodukte wurden nach *Anderson* und *Cree*<sup>5)</sup> methyliert. Die nachfolgende saure Hydrolyse lieferte für die polarere Substanz folgende Methylzucker: 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose, 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose und 3.6-Dimethyl-D-glucose (vgl. mit den Methylzuckern aus dem permethylierten Avenacosid A)<sup>1)</sup>. Die 2.4.6-Trimethyl-D-glucose trat nicht mehr auf. Die abgespaltene Glucoseeinheit muß folglich an C-3 derjenigen Glucose gebunden gewesen sein, die nach der Hydrolyse des permethylierten Avenacosids B die 2.4.6-Trimethyl-D-glucose geliefert hatte.

Bei der weniger polaren Substanz ließen sich nach Hydrolyse als Aglykon Nuatigenin und als Zucker 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose, 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose und 2.3.6-Trimethyl-D-glucose nachweisen. Anstelle der 3.6-Dimethyl-D-glucose, die noch bei der Hydrolyse des permethylierten polareren Produkts entstanden war, trat jetzt die 2.3.6-Trimethyl-D-glucose auf. Daraus folgt, daß die zweite enzymatisch abgespaltene Glucoseeinheit an C-2 der geninständigen, für die Verzweigung der Zuckerkette verantwortlichen Glucoseeinheit gesessen haben muß.

Aufgrund der beschriebenen Untersuchungen läßt sich über die Struktur des Avenacosids B folgendes aussagen:

Als Aglykon liegt Nuatigenin (1) vor; dieses trägt an C-26 eine D-Glucoseeinheit und an C-3 eine verzweigte Zuckerkette, bestehend aus einer in 2'-Stellung durch [ $\beta$ -D-Glucopyranosido-(1 $\rightarrow$ 3)]-D-glucose und in 4'-Stellung durch die verbliebene L-Rhamnose substituierte D-Glucose. Die vier Glucoseeinheiten sind  $\beta$ -glykosidisch verknüpft (Formel 5), da sie von  $\beta$ -Glucosidasen abgespalten werden. Die Konfiguration an C-1 der L-Rhamnose läßt sich nicht sicher zuordnen; da in der Natur bisher in Glykosiden vorwiegend L-Rhamnose Derivate mit  $\alpha$ -Konfiguration aufgefunden wurden<sup>6)</sup>, darf man annehmen, daß auch beim Avenacosid B ein  $\alpha$ -L-Rhamnosid vorliegt.



Das Aglykon des Avenacosids B, Nuatigenin, läßt sich nach der sauren Hydrolyse nur schlecht nachweisen, da es sich unter diesen Bedingungen bereits zum Teil in

<sup>6)</sup> Vgl. z. B. *W. Klyne*, *Biochem. J.* **47**, XLI (1950).

Isonuatigenin (2) umlagert<sup>3)</sup>. Durch die massenspektroskopische Fragmentierung der an C-26 substituierten Verbindungen 3 und 4 ist das Vorliegen von Nuatigenin gesichert.

Über die Strukturbestimmung des Avenacosids C, das noch polarer als Avenacosid B ist und noch stärker bitter schmeckt, werden wir demnächst berichten.

Herrn Prof. Dr. G. Legler danken wir für die Überlassung der Enzympräparate, Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Wulff für diverse Ratschläge und die bereitwillige Überlassung der Vergleichszucker und Herrn Dr. M. Tauscher für die Überlassung des Avenacosids, mehrerer Vergleichssubstanzen und für wertvolle Hinweise. Der *Stiftung Volkswagenwerk* danken wir für die zur Anschaffung der Massenspektrometer bereitgestellten Mittel und dem *Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes 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 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.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) an Kieselgel G (Merck) wurde wie üblich durchgeführt<sup>7)</sup>. Angefärbt wurde mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1 : 2) oder mit Anilinphthalat in Isobutylalkohol<sup>8)</sup>. Zur Papierchromatographie wurde das Papier 2043 b (Schleicher & Schüll) verwendet. Die Chromatogramme wurden absteigend entwickelt. Zur Säulenchromatographie benutzte man Kieselgel (Gebr. Hermann, Köln) bzw. Aluminiumoxid neutral (Woelm).

Folgende Fließmittelsysteme wurden für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie angewendet:

A: Chloroform/Methanol/Wasser 65 : 35 : 10<sup>9)</sup>

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

C: Benzol/Aceton 10 : 3

D: Benzol/Aceton 10 : 1

E: Benzol/Methanol 10 : 1

F: Chloroform

Fließmittelsysteme für die Papierchromatographie:

G: n-Butanol/Wasser/Tetrachlorkohlenstoff 4 : 4 : 3<sup>10)</sup>

H: n-Butanol/Butanon, gesättigt mit Boratpuffer vom pH 8.94<sup>11)</sup> 1 : 1

I: Pyridin/Eisessig/Essigester/Wasser 5 : 1 : 5 : 3<sup>12)</sup>

K: Butanon, gesättigt mit Ammoniak aqu. (2proz.)<sup>13)</sup>

<sup>7)</sup> R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

<sup>8)</sup> S. M. Partridge, Nature [London] **164**, 443 (1949).

<sup>9)</sup> T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **11**, 1546 (1963).

<sup>10)</sup> R. Tschesche und G. Wulff, Tetrahedron [London] **19**, 621 (1963).

<sup>11)</sup> M. T. Krauss, H. Jäger, O. Schindler und T. Reichstein, J. Chromatogr. [Amsterdam] **3**, 63 (1960).

<sup>12)</sup> F. G. Fischer und H. Dörfel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **301**, 224 (1955).

<sup>13)</sup> S. C. Williams und J. K. N. Jones, Canad. J. Chem. **45**, 275 (1966).

*Avenacosid B* konnte nicht kristallin erhalten werden. Daher wurde auf eine C,H-Analyse verzichtet. Die Struktur ist gesichert durch die quantitative Bestimmung des Glucose/Rhamnose-Verhältnisses (4:1), durch die Hydrolyse des permethylierten Glykosids und die massenspektrometrische Bestimmung der Verbindungen 3 und 4.

*Methylierung von Avenacosid B*: 2 g *Avenacosid B*<sup>1)</sup> wurden unter Rühren in 200 ccm Dimethylsulfoxid gelöst. Innerhalb einer Stde. wurden etwa 2 g *Natriumhydrid* in kleinen Portionen hinzugegeben. Dabei wurde die Lösung hellgelb. Dann wurden im Zeitraum von 2 Stdn. 10 ccm *Methyljodid* hinzugegeben. Nach 2 Tagen intensiven Rührens bei Raumtemp. wurden erneut die gleichen Mengen *Natriumhydrid* und *Methyljodid* wie oben zugefügt — insgesamt dreimal.

Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung langsam in 1.5 l Wasser gegossen. Um das überschüssige *Methyljodid* zu entfernen, wurde 2 Stdn. lang Luft durch die wäbr. Lösung gesaugt. Die ausgefallenen Methylierungsprodukte wurden anschließend abgesaugt. Der Rückstand wurde in Chloroform gelöst. Durch 5maliges Waschen mit je 100 ccm Chloroform wurden eventuell noch gelöste Methylierungsprodukte aus der wäbr. Phase extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Phasen wurden anschließend 5mal mit je 100 ccm Wasser gewaschen, um das Dimethylsulfoxid zu entfernen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Es fielen 2.2 g eines dunkelbraunen Öls an, das an 500 g Aluminiumoxid im System D und an 500 g Kieselgel im System E gereinigt wurde. Man erhielt 1.4 g *permethyliertes Avenacosid B*, das im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr zeigte.

*Hydrolyse des permethylierten Avenacosids B*: 1.4 g des *permethylierten Saponins* wurden mit 50 ccm 5proz. methanol. *Salzsäure* 6 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde mit 100 ccm Wasser verdünnt, das Methanol i.Vak. abdestilliert und der Niederschlag abfiltriert. Dieser enthielt neben *Nuatigenin* (1) und *Isonuatigenin* (2) noch mehrere weniger polare Substanzen. Insgesamt konnten 0.5 g Aglykongemisch erhalten werden. Die  $R_F$ -Werte von *Nuatigenin* und *Isonuatigenin* liegen im DC im System E bei 0.25 und 0.27, der  $R_F$ -Wert der nächstweniger polaren Substanz bei 0.31. Eine Nachhydrolyse mit 10proz. methanol. *Salzsäure* ergab neben *Nuatigenin* und *Isonuatigenin* als Zucker nur 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose, die sich papierchromatographisch im System G nachweisen ließ. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Substanz um *Nuatigenin-26-[2.3.4.6-tetramethyl- $\beta$ -D-glucosid]*<sup>1)</sup>. Das Filtrat wurde i.Vak. auf ca. 20 ccm eingeeengt, mit etwa 50 ccm 2*n* HCl versetzt und 15 Stdn. unter Rückfluß erhitzt, um die gebildeten Methylglykoside zu hydrolysieren. Danach waren dünnschichtchromatographisch im System C vier mit Anilinphthalat anfärbbare Zucker nachweisbar. Die Säure wurde über Ionenaustauscher (Dowex 3, OH-Form) entfernt, die Lösung i.Vak. eingedampft und das resultierende Zuckergemisch an 300 g Kieselgel (71—90  $\mu$ ) mit Benzol/Aceton-Gemischen steigender Polarität (10:1, 10:2, 10:4, 3:2 und 1:1) chromatographiert. So erhielt man 204 mg 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose, 356 mg 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose, 275 mg 2.4.6-Trimethyl-D-glucose und 207 mg 3.6-Dimethyl-D-glucose. Die Identifizierung der Zucker geschah folgendermaßen:

2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose als *Anilid*: Der erhaltene Sirup von 2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose wurde in 10 ccm absol. Methanol mit 0.25 ccm *Anilin* und 15 mg Ammoniumchlorid 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Verdünnen mit 20 ccm Wasser wurde die Reaktionslösung dreimal mit je 200 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Der i. Vak. zur Trockne gebrachte Chloroformauszug wurde an 100 g Kieselgel im System D chromatographiert. Es ließen sich 169 mg des *Anilids* vom Schmp. 123—124° (aus Äther/Petroläther umkristallisiert) isolieren, nach Mischprobe, IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten identisch mit autbent. Material.

**2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose:** Schmp. 92–94° (aus Petroläther),  $[\alpha]_D^{20}$ : +77.8° (Enddrehung,  $c = 1.05$  in Wasser). Nach Mischprobe, IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten war die Verbindung identisch mit authent. Material.

**2.4.6-Trimethyl-D-glucose:** Schmp. 121–122° (aus Äther/Petroläther),  $[\alpha]_D^{25}$ : +71° (Enddrehung,  $c = 1.03$  in Wasser). Mischprobe, IR-Spektrum und chromatographisches Verhalten erwiesen Identität mit authent. Material.

**3.6-Dimethyl-D-glucose:** Schmp. 114–117° (aus Essigester),  $[\alpha]_D^{20}$ : +60.8° (Enddrehung,  $c = 1.01$  in Wasser). Nach Mischprobe, IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten war die Verbindung identisch mit authent. Material. Durch Papierchromatographie in den Systemen G, H und K konnten alle anderen Dimethylglucosen ausgeschlossen werden ( $R_F$ -Werte 0.16; 0.46; 0.17).

**Enzymatische Spaltung mit  $\beta$ -Glucosidase E.L. 27-67 (Röhm & Haas):** 2.3 g *Avenacosid B* wurden in 200 ccm verd. Salzsäure (pH 4) mit einer Lösung von ca. 1 g Enzym in 200 ccm Salzsäure (pH 4) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde gut geschüttelt und 10 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Danach ließen sich im System B dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel G 7 Spaltprodukte mit den  $R_F$ -Werten 0.22, 0.26, 0.40, 0.48, 0.63, 0.85 und 0.95 nachweisen. Das Enzym wurde durch Zufügen von 200 ccm Methanol und  $1/2$  stdg. Kochen unter Rückfluß ausgeflockt. Nach Abfiltrieren und Abdampfen des Methanols wurde die wäßr. Phase 5 mal mit je 100 ccm n-Butanol ausgeschüttelt. Zur Vorreinigung wurde der Butanol-Extrakt an 80 g Kieselgel im System A chromatographiert. Dabei gelang eine Grobtrennung in zwei Fraktionen, Fraktion A (0.8 g) enthielt die Produkte mit  $R_F$ -Wert 0.40 und größer (im System B dünn-schichtchromatographisch geprüft), Fraktion B (0.7 g) enthielt die Produkte mit  $R_F$ -Wert 0.40 und kleiner. Durch Chromatographie an 150 g Kieselgel (90–100  $\mu$ ) im System Chloroform/Methanol (10:1) ließen sich aus Fraktion A 150 mg *Nuatigenin-26- $\beta$ -D-glucosid* rein gewinnen ( $R_F$ -Wert 0.85 im System B).

Durch Chromatographie an 200 g Kieselgel (71–90  $\mu$ ) im System A waren aus Fraktion B 53 mg *26-Desgluco-avenacosid B* ( $R_F$ -Wert 0.22 im System B) isolierbar.

***Nuatigenin-26-[tetramethyl-D-glucosid]-3-methyläther (3):*** Zu 150 mg *Nuatigenin-26- $\beta$ -D-glucosid* in 30 ccm Dimethylsulfoxid wurden in kleinen Portionen 1.2 g *Natriumhydrid* gegeben und anschließend ca. 3 ccm *Methyljodid* zuge tropft. Nach 24 Stdn. wurde die gelbe Reaktionslösung in  $1/2$  l Wasser gegossen und wie üblich aufgearbeitet. Man erhielt so 40 mg eines gelben Öls, das nach chromatographischer Reinigung an 80 g Kieselgel im System D 25 mg **3** ergab. Es zeigte im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr. Sein Massenspektrum war identisch mit dem des **3** in l. c.<sup>1)</sup>. Nach Hydrolyse mit 5proz. methanol. Salzsäure ließen sich dünn-schichtchromatographisch im System E *Nuatigenin-* und *Isonuatigenin-3-methyläther* und papierchromatographisch im System G nur **2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose** nachweisen.

**Methylierung und Hydrolyse von 26-Desgluco-avenacosid B:** 53 mg *26-Desgluco-avenacosid B* wurden in 30 ccm Dimethylsulfoxid mit 200 mg *Natriumhydrid* und 0.5 ccm *Methyljodid* versetzt und 24 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Aufarbeitung wurden 74 mg eines gelben Öls erhalten, das im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr zeigte. Die salzsaure Hydrolyse ergab als Zucker **2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose**, **2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose**, **2.4.6-Trimethyl-D-glucose** und **3.6-Dimethyl-D-glucose**, nachgewiesen im System G durch ein Papierchromatogramm. Neben den Zuckern resultierten 15 mg Aglykongemisch, das an zwei präparativen Dünn-schichtplatten (10  $\times$  20 cm, 2.5 g Kieselgel G mit Fluoreszenz-Indikator P<sub>2</sub><sup>14)</sup> im System Benzol/Methanol 50:1) nach mehrfachem Entwickeln aufgetrennt wurde. Nach Elution mit Aceton ließen sich 3 mg **4** vom Schmp. 178–179° (aus Äther) gewinnen. Sein Massenspektrum war identisch mit dem des *Nuatigenin-26-methyläthers (4)*<sup>1)</sup>.

<sup>14)</sup> R. Tschesche, G. Biernoth und G. Wulff, J. Chromatogr. [Amsterdam] **12**, 342 (1963).

*Spaltung mit  $\beta$ -Glucosidase E.L. 12-63 (Röhm & Haas):* 6 g *Avenacosid B* und 6 g des Enzyms wurden in 800 ccm wäßr. *Salzsäure* vom pH 4 gelöst. Die Mischung wurde  $\frac{1}{2}$  Stde. bei Raumtemp. stehengelassen. Nach dieser Zeit ließen sich dünn-schichtchromatographisch an Kieselgel G im System B zwei Spaltprodukte,  $B_1$  und  $B_2$ , nachweisen ( $B_1$ :  $R_F$  0.24;  $B_2$ :  $R_F$  0.28). Sie waren identisch mit *Avenacosid A* und *Desgluco-avenacosid A*, letzteres aus der analogen Spaltung des Saponins A erhalten<sup>1)</sup>. Zur Ausflockung des Enzyms wurden 800 ccm Aceton zugegeben und 20 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abfiltrieren des Enzyms und Abdestillieren des Acetons wurde die wäßr. Lösung 4mal mit n-Butanol ausgeschüttelt. Der Butanolextrakt wurde an 1000 g Kieselgel (71–90  $\mu$ ) im System A chromatographiert. So konnten 1.2 g Spaltprodukte  $B_1$  und 1.1 g Spaltprodukte  $B_2$  rein erhalten werden. In der wäßr. Phase der Butanol-Extraktion ließ sich papierchromatographisch im System I nur *Glucose* nachweisen.

*Methylierung und Hydrolyse der Spaltprodukte  $B_1$  und  $B_2$ :* Das obige Material wurde, wie bei *Avenacosid B* beschrieben, methyliert und aufgearbeitet. Man erhielt 1.1 g permethyliertes Produkt  $B_1$  und 0.9 g permethyliertes Spaltprodukt  $B_2$ . Beide Methylierungsprodukte zeigten im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr. Nach Hydrolyse mit 5proz. *methanol. Salzsäure* und Abdestillieren des Methanols i. Vak. wurde das Aglykongemisch — in beiden Fällen *Nuatigenin* und *Isonuatigenin* — durch Filtrieren abgetrennt und die Lösung der Methylglykoside mit 2*n* HCl nachhydrolysiert. Nach Neutralisation am Ionenaustauscher erhielt man aus dem Spaltprodukt  $B_1$  folgende Methylzucker: *2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose*, *2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose* und *3.6-Dimethyl-D-glucose* (nachgewiesen durch ein Papierchromatogramm im System G und ein Dünnschichtchromatogramm im System C). Das Spaltprodukt  $B_2$  lieferte *2.3.4-Trimethyl-L-rhamnose*, *2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose* und *2.3.6-Trimethyl-D-glucose*. Die Trimethyl-D-glucose konnte papierchromatographisch im System G eindeutig identifiziert werden.