

Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette, VIII¹⁾

Asperosid, ein bisdesmosidisches 22-Hydroxyfurostanol-Glycosid aus *Smilax aspera* L.

Rudolf Tschesche*, Artur Harz und Jovan Petričić

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn*,

D-5300 Bonn, Meckenheimer Allee 168, und

Institut für Pharmakognosie der Pharmaceutisch-Biochemischen Fakultät der Universität Zagreb

Eingegangen am 3. September 1973

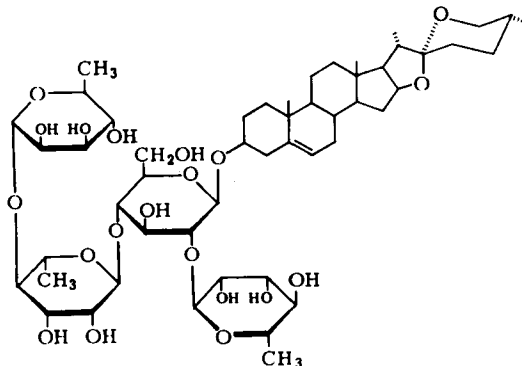
Von Asperosid (**2a**), einem 22-Hydroxyfurostanol-Glycosid aus *Smilax aspera* L. und dem daraus durch enzymatische Hydrolyse hergestellten Spirostanol-Glycosid Asperin (**1**) wurden die Strukturen ermittelt. Die Verknüpfungsart und die Sequenz der Zucker am OH an C-3 des Aglykons wurden durch Permethylierung, Spaltung und Identifizierung der gebildeten Methylzucker aus **1** und **2a** bzw. **2b**, durch massenspektroskopische Untersuchungen sowie durch Partialhydrolyse bestimmt.

Steroid Saponins with More than One Sugar Chain, VIII¹⁾

Asperoside, a Bisdesmosidic 22-Hydroxyfurostanol Glycoside of *Smilax aspera* L.

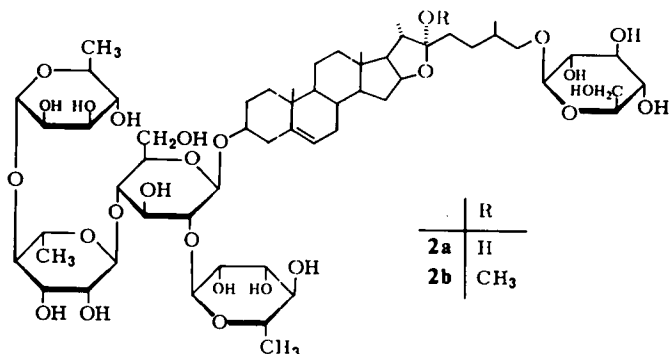
The structures of asperoside (**2a**), a 22-hydroxyfurostanol glycoside of *Smilax aspera* L., and asperin (**1**), a spirostanol glycoside formed by enzymatic hydrolysis of **2a** or **2b**, have been elucidated. The structure of the sugar chain at the 3-OH group of the aglycon was determined by permethylation of **1** and **2a** or **2b** and identification of the methyl sugars obtained by hydrolysis, by mass spectrometry and partial hydrolysis.

1969 wurde mitgeteilt, daß das Hauptsaponin aus *Smilax aspera* L. ebenfalls zu den 22-Hydroxyfurostanol-Glycosiden gehört und bei der enzymatischen Spaltung in das Spirostanol-Glycosid Asperin (**1**) mit dem Aglykon Diosgenin übergeht²⁾; wir berichten jetzt über die Strukturaufklärung des Asperosids (**2a**).



1) VII. Mitteil.: R. Tschesche, K. H. Hermann, R. Langlais, B. T. Tjoa und G. Wulff, Chem. Ber. 106, 3010 (1973).

2) J. Petričić und A. Radčević, Farm. Glas. 25, 91 (1969) [C. A. 71, 64049 w (1969)].



Strukturermittlung des Asperins (1)

Die saure Hydrolyse von 1 lieferte als Aglykon Diosgenin und als Zucker L-Rhamnose und D-Glucose; bei der quantitativen Zuckeranalyse durch Gaschromatographie der persilylierten Methylglycoside ergab sich deren Verhältnis zu 3:1.

Zur Ermittlung der Zuckerverknüpfung wurde 1 zunächst nach *Hakomori*³⁾ permethyliert und anschließend sauer gespalten. Nach üblicher Aufarbeitung und säulenchromatographischer Trennung konnten 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose, 3,6-Di-O-methyl-D-glucose und 2,3-Di-O-methyl-L-rhamnose im Verhältnis 2:1:1 erhalten werden. Die Methylzucker wurden entweder direkt (3,6-Di-O-methyl-D-glucose) oder als Derivate (Anilide) kristallin erhalten und mit authentischem Material identifiziert. Die gefundene 3,6-Di-O-methyl-D-glucose zeigte eine Verzweigung der Kette an, folglich müssen zwei endständige Permethylyzucker in 1 auftreten.

Erste Einblicke in die Sequenz der Monosaccharide konnten dem Massenspektrum des permethylierten Asperins entnommen werden. Die Peaks bei *m/e* 363, 331 und 275 können nur aus einer Kette von zwei Monodesoxyhexosen entstanden sein⁴⁾, die D-Glucose dürfte daher direkt mit dem Aglykon verbunden sein.

Durch Partialhydrolyse⁵⁾ von 1 in Dioxan/0,075 N HCl (1:2) ließ sich dieser Befund sichern und die Zuckerverknüpfung klären. Es wurden so alle für die Strukturklärung notwendigen zuckerärmeren Glycoside und neben einem Monosaccharid auch ein Disaccharid erhalten. Das Aglykon selbst entstand unter diesen Bedingungen nicht. Das Monosaccharid wurde chromatographisch als Rhamnose identifiziert, während das Disaccharid nach saurer Hydrolyse nur Rhamnose lieferte, also nach dem Ergebnis der Permethylierung und Hydrolyse eine 4-O-(α -L-Rhamnopyranosyl)- α -L-rhamnose sein muß.

Die unpolarste Verbindung, Glycosid I, ergab nach saurer Hydrolyse nur D-Glucose; das Permethylderivat lieferte nach üblicher Aufarbeitung 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose, d. h. die D-Glucose ist mit dem Aglykon verknüpft.

³⁾ S. *Hakomori*, J. Biochem. **55**, 205 (1964) [C. A. **60**, 15959 (1964)].

⁴⁾ K. *Heyns*, H. F. *Grützmaier*, H. *Scharmann* und D. *Müller*, Fortschr. Chem. Forsch. **5**, 448 (1966).

⁵⁾ R. *Tschesche* und G. *Wulff*, Tetrahedron **19**, 621 (1963).

Als Hauptprodukt entstand ein kristallines Triglycosid V, das sich nach Misch-Schmp. und chromatographischem Verhalten als identisch mit Dioscin erwies. Durch saure Spaltung der permethylierten Verbindung wurden 3,6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose und 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose erhalten. In wesentlich geringerer Menge fiel noch das für die Sequenzermittlung wichtige Triglycosid IV an, das zwei Rhamnosemoleküle kettenförmig verknüpft enthält. Das Massenspektrum des permethylierten Triglycosids zeigte wiederum die Peaks bei *m/e* 363, 331, 275, die von den zwei miteinander verknüpften Desoxyhexosen herrühren. Die Säurehydrolyse des permethylierten Glycosids ergab die drei Methylzucker 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose, 2,3-Di-*O*-methyl-*L*-rhamnose und 2,3,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose, die durch Vergleich mit authentischem Material identifiziert werden konnten. Aus dem Auftreten der 2,3,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose folgt, daß in **1** am 2-OH der *D*-Glucose sich ein Molekül *L*-Rhamnose befindet, während über die Hydroxylgruppe an C-4 zwei weitere Moleküle *L*-Rhamnose gebunden sind.

Abgesichert wird diese Struktur durch ein weiteres Bruchstück, ein Diglycosid III, das in größerer Ausbeute erhalten wurde. Dieses trägt am 2-OH der *D*-Glucose ein Molekül *L*-Rhamnose. In entsprechender Menge wurde auch das Disaccharid 4-*O*-(α -*L*-Rhamnopyranosyl)- α -*L*-rhamnose aufgefunden, woraus geschlossen werden muß, daß beide miteinander verknüpften *L*-Rhamnosens mit dem 4-OH der *D*-Glucose verbunden sind. Das Disaccharid kann aufgrund der erhaltenen Menge keinem anderen Bruchstück zugeordnet werden. Weiterhin wurde dünnschichtchromatographisch festgestellt, daß bei noch milderem Hydrolysebedingungen (Dioxan/0,05 N HCl 1:1) neben *L*-Rhamnose und 4-*O*-(α -*L*-Rhamnopyranosyl)- α -*L*-rhamnose nur die Glycoside III, IV und V in geringer Ausbeute entstanden. Bei saurer Hydrolyse des permethylierten Diglycosids traten als Methylzucker 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose und 3,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose im Verhältnis 1:1 auf.

Strukturaufklärung des Asperosids (2a)

Zur vollständigen Aufklärung der Zuckerketten im Asperosid wurde zunächst eine quantitative Zuckerbestimmung der persilylierten Methylglycoside durchgeführt. Dabei wurde für *L*-Rhamnose und *D*-Glucose ein Verhältnis von 3:2 ermittelt, das bedeutet, daß sich vermutlich am C-26 des Aglykons ein Molekül *D*-Glucose befinden wird, während die Zusammensetzung der Zuckerkette am 3-OH mit der in **1** übereinstimmen sollte. Die durch Permethylierung des Gemisches von **2a** und **2b** und anschließende saure Hydrolyse entstandenen Methylzucker wurden säulenchromatographisch getrennt. Es konnten 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose, 3,6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose, 2,3-Di-*O*-methyl-*L*-rhamnose und 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose im Verhältnis von 2:1:1:1 erhalten werden. Alle vier Methylzucker fielen entweder direkt (3,6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose und 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose) oder in Form ihrer Anilide (2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose und 2,3-Di-*O*-methyl-*L*-rhamnose) kristallin an und wurden durch Vergleich mit authentischem Material identifiziert. Da bis auf die 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose die gleichen Methylzucker im gleichen Verhältnis wie bei **1** entstanden, sind die Zuckerketten am 3-OH von **1** und **2a** bzw.

2b identisch. Die durch die 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose angezeigte endständige *D*-Glucose ist daher über die 26-OH-Gruppe an das Furostanolgerüst gebunden.

Bei der sauren Hydrolyse von **2a** bzw. **2b** war als Aglykon Diosgenin angefallen. Aber nicht Diosgenin, sondern Furost-5-en-3 β ,22 α ,26-triol ist das wahre Aglykon; dies zeigt das IR-Spektrum von **2a** bzw. **2b**, in dem die typischen Banden der Spirostanol-Absorption bei 845, 892 und 912 cm⁻¹ fehlen, während sie im IR-Spektrum von **1** auftreten²⁾. Zum Beweis der Furostanolstruktur mit Zuckerresten am 3-OH und 26-OH wurden **2a** bzw. **2b** in Methanol mit Platin(IV)-oxid hydriert. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen wird neben der Doppelbindung in Δ^5 nur die 22-Hemiacetalgruppierung im Aglykon hydriert⁶⁾. Die saure Hydrolyse von hydriertem Asperosid lieferte ein wesentlich polares Aglykon, nämlich Tetrahydrodiosgenin, das durch Vergleich mit authentischem Material identifiziert werden konnte. Als weiterer Beweis der Furostanolstruktur wurde die Reduktion von Asperosid mit NaBH₄ in wäßriger Lösung herangezogen. Nach saurer Spaltung wurde ein wesentlich polares Aglykongemisch erhalten, darunter Dihydrodiosgenin, während bei der sauren Hydrolyse von nicht reduziertem Asperosid nur Diosgenin entsteht. Spirostanole werden unter diesen Reaktionsbedingungen nicht hydrierend angegriffen⁷⁾. Weiterhin geht **2a** bei der Behandlung mit Orthoameisensäure-methylester quantitativ in das unpolare **2b** (22-Vollacetal) über²⁾.

Aufgrund der beschriebenen Untersuchungen ergibt sich für Asperosid (**2a**) folgende Struktur: 3-*O*-{[α -L-Rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-glucopyranosyl}-26-*O*-{ β -*D*-glucopyranosyl}-(25*R*)-furost-5-en-3 β ,22 α ,26-triol.

Die β -glycosidische Bindung der beiden *D*-Glucosen folgt aus der Spaltbarkeit mit β -Glucosidase⁸⁾, die α -glycosidische Bindung der drei *L*-Rhamnosens aus der Hydrolyse mit α -Rhamnosidase⁹⁾.

Wie andere Furostanolsaponine¹⁰⁾ besitzt das beschriebene Furostanolsaponin keine hämolytische Aktivität, während das dazugehörige Spirostanolderivat stark hämolytisch wirksam ist.

Hämolytische Wirksamkeit der isolierten Saponine

Asperosid > 100 μ g/ml

Asperin 0.3 μ g/ml

Asperosid zeigt in der Konzentration von 5 mg/ml keine Wirkung auf Bakterien und niedere Pilze, während Asperin das Wachstum der Pilze *Cryptococcus neoformans*²⁾ und *Trichoderma viride* schwach inhibiert. Es tritt also eine antibiotische Aktivitätsverstärkung ein, sobald das bisdesmosidische Furostanolsaponin in das monodesmosidische Spirostanolderivat übergeht. Dieser Sachverhalt ist auch von anderen bisdesmosidischen Prosaponinen bekannt¹⁰⁾.

6) R. Tschesche, B. T. Tjoa, G. Wulff und R. V. Noronha, Tetrahedron Lett. **1968**, 5141.

7) R. Tschesche, G. Lüdke und G. Wulff, Tetrahedron Lett. **1967**, 2785; Chem. Ber. **102**, 1253 (1969).

8) G. Legler, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **348**, 1359 (1967).

9) R. Schwarz, Diplomarbeit Univ. Bonn 1969.

10) G. Wulff, Deut. Apoth.-Ztg. **108**, 797 (1968).

Dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, dem Land Nordrhein-Westfalen für die Gewährung eines Stipendiums (für A. Harz), Herrn Prof. Dr. G. Wulff für viele wertvolle Ratschläge. Herrn Prof. Dr. F. Schönbeck sei für die mikrobiologischen Untersuchungen, Herrn Priv.-Doz. Dr. E. Schloesser für die Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit sowie Herrn Prof. Dr. G. Legler für die Überlassung der Enzympräparate vielmals gedankt. Unser Dank gilt ferner der Stiftung Volkswagenwerk für die zur Anschaffung des Massenspektrometers bereitgestellten Mittel.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch nach Kofler-Weygand und die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Die IR-Spektren sind mit dem Spektrophotometer Perkin-Elmer, Modell 221, mit Gitter-Prismen-Austauscheinheit, die Massenspektren mit dem Gerät MS 9 der A.E.I. im Direkt-Einlaß-Verfahren bei einer Elektronenenergie von 70 eV aufgenommen worden. Die C,H,N-Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium Dr. F. Pascher, Bonn, angefertigt. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte wie üblich an Kieselgel G (Merck)¹¹⁾. Angesprüht wurde mit 30proz. Schwefelsäure oder mit Anilinphthalat in Isobutylalkohol¹²⁾. Zur Papierchromatographie verwendete man das Papier Whatman Nr. 1, entwickelt wurden die Chromatogramme absteigend. Zur Säulenchromatographie benutzte man Kieselgel M (0.05–0.1 mm) der Fa. Gebr. Herrmann, Köln, zur Gelfiltration Sephadex G 25 (fein 20–80 μ) der Fa. Roth.

Fließmittelsysteme für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie waren: A: Chloroform/Methanol/Wasser (65:30:5)¹³⁾, B: Chloroform/Methanol/Wasser (65:20:10, organische Phase + 3% Methanol), C: Chloroform/Methanol/Wasser (65:20:10, organische Phase + 10% Methanol), D: Benzol/Aceton (3:4), E: Benzol/Aceton (1:1), F: Benzol/Aceton (20:3), G: Benzol/Aceton (10:1), H: Benzol/Aceton (4:1).

Fließmittelsysteme für die Papierchromatographie: I: Essigester/Pyridin/Wasser (3.6:1:1.15)¹⁴⁾, K: Benzol/Äthanol/Wasser/Ammoniak (200:47:14:1)¹⁵⁾, L: n-Butanol/Wasser/Tetrachlorkohlenstoff (4:4:3)¹⁶⁾.

Die Gaschromatographie erfolgte mit dem Gerät F7/HF von Perkin-Elmer mit Integrator D2 und Kienzle-Digitaldrucker. Als Detektoren dienten eine Wärmeleitfähigkeitszelle und ein Flammenionisationsdetektor, Trägergas war Helium bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 30 ml/min. Einspritzblock und Detektor wurden auf 250°C, der Säulenofen auf 175°C geheizt.

Die enzymatischen Spaltungen führte man mit einer β -Glucosidase⁸⁾ und einer α -Rhamnosidase⁹⁾ aus *Aspergillus wentii* durch.

Isolierung der Saponine: 2.4 kg luftgetrocknete Blätter wurden mit 90proz. Methanol mit Hilfe eines Ultra-Turrax erschöpfend extrahiert, den Extrakt dampfte man ein, nahm in Wasser auf und entfernte das Chlorophyll zweimal durch Ausschütteln mit Benzol. Anschließend wurde die wäßr. Phase fünfmal mit je 2 Liter n-Butanol extrahiert, die vereinigten Butanolphasen ergaben, i. Vak. bei 45°C zur Trockne gebracht, 90 g sirupöses Produkt. Je 30 g des Butanolextraktes wurden auf 60 g Kieselgel aufgezogen und an 1.7 kg Kieselgel mit

¹¹⁾ R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

¹²⁾ S. M. Partridge, Nature (London) **164**, 443 (1949).

¹³⁾ T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. Pharm. Bull. **11**, 1564 (1963).

¹⁴⁾ P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirota, G. Ruffini und A. Sartori, J. Chromatogr. **3**, 343 (1960).

¹⁵⁾ H. C. Srivastawa und G. Adams, Can. J. Chem. **40**, 1415 (1962).

¹⁶⁾ R. Tschesche und G. Wulff, Tetrahedron **19**, 621 (1963).

dem System A chromatographiert: 13.5 g Rohsaponin. Ein Teil davon wurde zur weiteren Reinigung (vor allem zur Entfernung von D-Glucose) einer Gelfiltration an Sephadex G 25 unterworfen. 1 g Rohsaponin, das an 100 g Sephadex G 25 mit Wasser als Elutionsmittel getrennt wurde, lieferte 0.45 g **2a** bzw. **2b**.

IR (in KBr): Die charakteristischen IR-Absorptionen der Spiroacetal-Gruppierung^{17,18)} bei 845, 892 und 912 cm^{-1} , die in KBr gut zu erkennen sind, fehlen.

Hydrierung: 65 mg **2a** bzw. **2b** wurden in 10 ml Methanol 6 d bei Raumtemp. mit ca. 100 mg Adams-Katalysator (Pt^{IV} -Oxid, Degussa-Hanau, 81.21% Pt) hydriert, danach filtrierte man vom Katalysator ab und befreite vom Lösungsmittel. Nach 4stdg. Hydrolyse mit 5proz. methanol. HCl bei 100°C und chromatographischer Trennung an Kieselgel mit dem System F wurden 2 mg Tetrahydrodiosgenin (Schmp. 168–172°C) erhalten, das mit aus Diosgenin durch katalytische Hydrierung in Eisessig¹⁹⁾ gewonnenem Material identisch war (chromatographisches Verhalten, Misch-Schmp.).

MS: *m/e* 418, 400, 344, 331, 273, 255, 144.

NaBH₄-Reduktion: 0.25 g **2a** bzw. **2b** in 70 ml Wasser wurden mit 0.3 g NaBH₄ versetzt und 16 h bei Raumtemp. stehengelassen. Anschließend wurde mit konz. Salzsäure auf 3 N an HCl gebracht, mit 40 ml Benzol überschichtet und 5 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen trennte man die Benzolphase ab und schüttelte die wäbr. Lösung noch zweimal mit Chloroform aus. Die vereinigten organischen Phasen brachte man zur Trockne und chromatographierte das erhaltene Substanzgemisch an 20 g Kieselgel mit dem System F. Neben 30 mg Diosgenin (aufgrund unvollständiger Reduktion) fielen 42 mg eines polareren Aglykongemisches an, aus dem 4 mg Dihydrodiosgenin (das einen dem Tetrahydrodiosgenin vergleichbaren R_F -Wert besitzt) isoliert wurden. Dem Massenspektrum wurde entnommen, daß es sich nach der Mol.-Masse um Dihydrodiosgenin handelt. Die einzelnen Peaks sind gegenüber denen des Tetrahydrodiosgenins jeweils um zwei Masseneinheiten verschoben.

MS: *m/e* 416, 398, 342, 329, 271, 253.

*Enzymatische Spaltung mit β -Glucosidase aus *Aspergillus wentii*:* Zu 10 g Rohsaponin in 300 ml Wasser wurden einige Tropfen Toluol und 25 ml Enzymlösung gegeben und 5 d im Brutschrank bei 39°C belassen. Anschließend befreite man vom Lösungsmittel und flockte das Enzym durch kurzes Aufkochen in Methanol aus. Das Lösungsmittel wurde abgezogen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und die Suspension mehrmals mit n-Butanol ausgeschüttelt. Die organische Phase brachte man zur Trockne und chromatographierte an Kieselgel mit dem System A. Ausb. 3.5 g **1**.

Asperin (1): Schmp. 222–231°C (aus Methanol); $[\alpha]_D^{25} = -100^\circ$ ($c = 1.0$, Pyridin)²⁾.

$\text{C}_{51}\text{H}_{82}\text{O}_{20}$ (1015.2) Ber. C 60.34 H 8.14 Gef. C 60.70 H 8.66

Hydrolyse von 1: 80 mg **1** wurden in 25 ml Dioxan/Wasser (1:1) (2 N an HCl) 5 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abdestillieren des Dioxans extrahierte man das Aglykon (Diosgenin) mit Chloroform. In der wäbr. Phase ließen sich L-Rhamnose und D-Glucose papier- und dünnstichchromatographisch (in den Systemen I und A) nachweisen.

Bei der Hydrolyse von **2a** bzw. **2b** wurden die gleichen Zucker erhalten.

¹⁷⁾ R. Tschesche, G. Wulff und G. Balle, *Tetrahedron* **18**, 959 (1962).

¹⁸⁾ M. E. Wall, C. R. Eddy, M. L. McClennan und M. E. Klumpp, *Anal. Chem.* **24**, 1337 (1952).

¹⁹⁾ I. Scheer, R. B. Ksotic und E. Mosettig, *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 4871 (1953), und **77**, 641 (1955).

Quantitative Zuckerbestimmung: Zur quantitativen Zuckerbestimmung²⁰⁾ wurden 50 mg 1 mit 5proz. methanol. HCl gespalten und die Lösung mit Silbercarbonat neutralisiert. Die resultierenden Methylglycoside überführte man in die Silylverbindungen. Die gaschromatographische Bestimmung lieferte für D-Glucose und L-Rhamnose ein Verhältnis von 1:2.84.

Die quantitative Zuckerbestimmung von 2a bzw. 2b ergab für D-Glucose und L-Rhamnose ein Verhältnis von 2:2.8.

Hydrolyse von 1 mit α -Rhamnosidase: 15 mg 1 wurden in 20 ml Wasser aufgeschlämmt, mit 2 ml einer Enzymlösung mit α -Rhamnosidase- und β -Glucosidase-Aktivität versetzt und eine Woche bei 39°C belassen. Ein Dünnschichtchromatogramm im System G zeigte, daß Diosgenin entstanden war.

Methylierung von 1: 584 mg 1 wurden unter Rühren in 30 ml Dimethylsulfoxid gelöst, 400 mg Natriumhydrid hinzugefügt und nach 3 h mit 2 ml Methyljodid versetzt. Alle 12 h erfolgte erneut Zugabe von je 100 mg Natriumhydrid und 1 ml Methyljodid. Nach 4 d wurde das Reaktionsgemisch in 300 ml Wasser gegeben und noch eine Stunde gerührt. Anschließend schüttelte man viermal mit je 100 ml Chloroform aus, wusch die vereinigten Chloroformphasen mehrmals zur Entfernung des Dimethylsulfoxids mit Wasser und brachte schließlich die Lösung zur Trockne. Das erhaltene Produkt wurde an 40 g Kieselgel mit dem System H chromatographiert. Es fielen 354 mg permethyliertes 1 an; die Vollständigkeit der Methylierung wurde mittels IR-Spektrums, das keine OH-Absorptionsbande enthielt, geprüft.

Hydrolyse des permethylierten Asperins: 350 mg permethyliertes 1 wurden in 55 ml 5proz. methanol. HCl 6 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit Wasser, destillierte das Methanol ab und saugte das ausgefallene Aglykon (84 mg) ab. Die wäbr. Lösung wurde stark eingeeengt, zur Spaltung der Methylglycoside mit 7 ml 2 N HCl versetzt und 5 h auf 100°C erhitzt. Anschließend neutralisierte man mittels Dowex 3 und befreite vom Lösungsmittel. Die drei Methylzucker (250 mg) wurden an 30 g Kieselgel mit Benzol/Aceton-Gemischen steigender Polarität (5:1, 3:1, 1:1) getrennt. Man erhielt 60 mg 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose, 37 mg 2,3-Di-O-methyl-L-rhamnose und 35 mg 3,6-Di-O-methyl-D-glucose. Die Methylzucker wurden wie folgt identifiziert:

2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose als Anilid: 30 mg des erhaltenen Sirups wurden in 3 ml Methanol mit 0.04 ml Anilin und 2 mg Ammoniumchlorid 2 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Zusatz von 50 ml Wasser schüttelte man zweimal mit je 50 ml Chloroform aus und dampfte die organische Phase ein. Der Rückstand wurde an Kieselgel im System G chromatographiert und dann aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Es wurden 22 mg Anilid vom Schmp. 124–126°C erhalten, nach Misch-Schmp., IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten identisch mit authent. Material.

2,3-Di-O-methyl-L-rhamnose als Anilid: Aus 30 mg Sirup wurde, wie vorstehend beschrieben, das Anilid dargestellt. Man chromatographierte an Kieselgel mit Benzol/Aceton (7:1) und kristallisierte aus Äther/Petroläther um. Es wurden 19 mg Anilid vom Schmp. 139 bis 141°C erhalten, nach Misch-Schmp., IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten identisch mit aus synthetischer 2,3-Di-O-methyl-L-rhamnose²¹⁾ gewonnenem Anilid.

3,6-Di-O-methyl-D-glucose: Schmp. 115–118°C (aus Essigester); $[\alpha]_D^{25} = +62.8^\circ$ (Enddrehung, $c = 0.286$, H₂O); sie war nach Misch-Schmp., IR-Spektrum, papier- und dünn-schichtchromatographischem Verhalten in den Systemen I und D identisch mit authent. Material.

²⁰⁾ G. Wulff, J. Chromatogr. 18, 285 (1965).

²¹⁾ V. C. Barry, J. E. McCormick und P. W. D. Mitchell, J. Chem. Soc. 1955, 222.

Partialhydrolyse von 1: 1.53 g **1** wurden in 35 ml Dioxan gelöst, mit 70 ml 0.075 N HCl versetzt und 6 h bei 80°C erhitzt. Unter diesen Bedingungen ging **1** zu Beginn der Hydrolyse gerade noch in Lösung. Nach dem Abkühlen wurde das Dioxan abgezogen, 50 ml Wasser hinzugefügt und dreimal mit *n*-Butanol extrahiert. Die vereinigten Butanolphasen wusch man zweimal mit Wasser und brachte sie zur Trockne. Das erhaltene Glycosidgemisch wurde auf 2 g Kieselgel aufgezogen und an 200 g Kieselgel chromatographiert. System B eluierte 27 mg Monoglycosid I, 26 mg Diglycosid II, 107 mg Diglycosid III, 30 mg Triglycosid IV, System C 200 mg Triglycosid V sowie 667 mg Ausgangsmaterial.

Die wäbr. Phase wurde mit Dowex 3 neutralisiert, das Lösungsmittel abgezogen und das erhaltene Zuckergemisch an 50 g Kieselgel mit System C chromatographiert. Man erhielt 103 mg *L*-Rhamnose und 46 mg eines Disaccharids. 6 mg des Disaccharids, mit 5 ml 2 N HCl versetzt und 6 h auf 100°C erhitzt, ergaben nach üblicher Aufarbeitung nur *L*-Rhamnose. Es handelte sich also um 4-*O*-(α -*L*-Rhamnopyranosyl)- α -*L*-rhamnose.

R_F-Werte im System A: *L*-Rhamnose 0.46; 4-*O*-(α -*L*-Rhamnopyranosyl)- α -*L*-rhamnose 0.34; 4-*O*-(α -*L*-Rhamnopyranosyl)- α -*L*-rhamnose-anilid 0.62.

Das Anilid, dargestellt wie vorstehend beschrieben, hat Schmp. 122–126°C (Zers., aus Aceton/Petroläther).



Hydrolyse und Methylierung des Monoglycosids I: Nach Hydrolyse in Dioxan/2 N HCl (1:1) konnte nur *D*-Glucose papierchromatographisch im System I nachgewiesen werden. 22 mg **I** wurden, wie beschrieben, methyliert und aufgearbeitet. Bei der sauren Spaltung entstand nur 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose, wie der Vergleich mit authent. Material zeigte.

Identifizierung des Triglycosids V: Schmp. 282–287°C (aus Methanol); die Substanz war nach chromatographischem Verhalten (Systeme A und B) und Misch-Schmp. identisch mit Dioscin. Nach Methylierung und üblicher Aufarbeitung wurden als Methylzucker 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose und 3,6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose erhalten, identisch mit authent. Material.

Methylierung und Hydrolyse des Triglycosids IV: 20 mg **IV** wurden wie vorstehend methyliert und aufgearbeitet. Man erhielt 13 mg permethyliertes **IV**, das im IR-Spektrum keine OH-Bande aufwies. Die saure Spaltung des permethylierten **IV** lieferte 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose, 2,3-Di-*O*-methyl-*L*-rhamnose und 2,3,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose. Die 2,3,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose konnte papier- und dünnschichtchromatographisch in den Systemen K, L, E durch Vergleich mit authent. Material identifiziert werden.

Methylierung und Hydrolyse des Diglycosids III: 84 mg **III** wurden wie oben methyliert, mittels IR-Spektrums auf vollständige Methylierung geprüft und an Kieselgel im System G chromatographiert. 85 mg permethyliertes **III** lieferten nach saurer Hydrolyse und säulenchromatographischer Trennung 10 mg 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose und 11 mg 3,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose. Die 3,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose wurde papier- und dünnschichtchromatographisch (in den Systemen K, L, E) durch Vergleich mit synthetischer²²⁾ 3,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose identifiziert.

Wird die Partialhydrolyse von **1** in Dioxan/0.05 N HCl (1:1) bei 75°C durchgeführt, so entstehen neben *L*-Rhamnose und 4-*O*-(α -*L*-Rhamnopyranosyl)- α -*L*-rhamnose nur die Glycoside **III**, **IV** und **V**; der Umsatz ist dabei sehr gering.

²²⁾ R. Kuhn, I. Löw und H. Trischmann, Chem. Ber. 90, 203 (1957).

Methylierung und Hydrolyse von 2a bzw. 2b: 210 mg an Sephadex gereinigtes **2a** bzw. **2b** wurden wie beschrieben methyliert. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde zur Prüfung auf vollständige Methylierung erneut methyliert, aufgearbeitet und hydrolysiert. Das Zuckergemisch chromatographierte man an Kieselgel mit einem Benzol/Aceton-Gemisch steigender Polarität (15:1, 10:1, 7:1, 1:1). Die Trennung lieferte 14 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose, 38 mg 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose, 20 mg 2,3-Di-*O*-methyl-*L*-rhamnose und 17 mg 3,6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose. Bis auf die 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose wurden die gleichen Methylzucker wie bei **1** erhalten. Sie wurden wie vorstehend mit authent. Material identifiziert.

2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose: Schmp. 89–91°C (aus Petroläther); $[\alpha]_D^{25} = +82^\circ$ (Endrehung, $c = 0.435$, H₂O); die Verbindung war nach Misch-Schmp., IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten identisch mit authent. Material.

[334/73]