

Über Triterpene, XXX¹⁾

Über das Hauptsaponin der Kornrade (*Agrostemma githago* L.)

Rudolf Tschesche* und Hans Schulze

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,
D-5300 Bonn, Max-Planck-Straße

Eingegangen am 21. März 1974

In den Samenkörnern der Kornrade (*Agrostemma githago* L.) findet sich als Hauptglycosid das monodesmosidische Triterpenglycosid Githagosid (**1a**). Saure Hydrolyse von **1b** liefert als Aglycon Gypsogenin und die Zucker D-Glucose, D-Xylose, D-Fucose und L-Rhamnose. Die Struktur der Zuckerkette konnte durch Permethylierung, Identifizierung der Methylzucker, Perjodat-Oxidation, enzymatischen Abbau und Partialhydrolyse ermittelt werden. Als Aglycon von Nebensaponinen der Kornrade wurde Quillajasäure festgestellt.

Triterpenes, XXX¹⁾

The Main Saponin of the Corncockle (*Agrostemma githago* L.)

A monodesmosidic triterpene glycoside, githagosid (**1a**), the main saponin of corncockle seeds, was investigated. Acid hydrolysis of **1b** yielded the aglycone gypsogenin and the sugars D-glucose, D-xylose, D-fucose, and L-rhamnose. The structure of the sugar chain was established by permethylation, identification of the resulting methyl sugars, periodate oxidation, enzymatic degradation, and partial hydrolysis. Another aglycone, quillaic acid, was identified in the residue of the minor saponins after hydrolysis.

1848 veröffentlichte Schulze²⁾ Untersuchungen über die Inhaltsstoffe der Kornrade (*Agrostemma githago* L.), einem Unkraut, dessen Samenkörner als Verunreinigung früher zu schweren Vergiftungen führten³⁾. Zwei Jahre danach berichtete Scharling⁴⁾ über jahrelange Arbeiten, wobei er auf die starke Schaumbildung des wäßrigen Extraktes der Samen hinwies. In Arbeiten der folgenden Jahrzehnte wurden die in den Samenkörnern enthaltenen Glycoside mit bereits aus anderen Pflanzen isolierten Saponinen verglichen. Brandl⁵⁾ unternahm erste Abbauersuche, während sich Wedekind⁶⁾ um die Strukturermittlung des Aglycons, von ihm Githagenin genannt, bemühte. 1940 erkannten Kon und Soper⁷⁾ durch Vergleich mit den von Wedekind angegebenen physikalischen Daten und Reaktionen des sogenannten Githagenins, daß es sich um Gypsogenin handeln müsse.

¹⁾ XXIX. Mittell.: R. Tschesche, H. Chandra Iha und G. Wulff, Tetrahedron **29**, 629 (1973).

²⁾ H. Schulze, Arch. Pharm. **1848**, 163.

³⁾ L. Lewin, Gifte und Vergiftungen, 4. Aufl., S. 649, Verlag Georg Stilke, Berlin 1929.

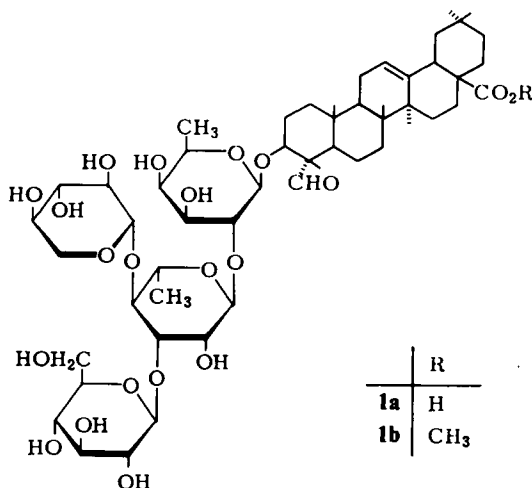
⁴⁾ E. A. Scharling, Liebigs Ann. Chem. **74**, 351 (1850).

⁵⁾ J. Brandl und A. Vierling, Arch. Exper. Pathol. Pharmac. **59**, 245 (1908) [C. **1906** I, 1350].

⁶⁾ E. Wedekind und W. Schicke, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **190**, 1 (1930).

⁷⁾ G. A. R. Kon und H. R. Soper, J. Chem. Soc. **1940**, 617.

Diese Arbeit befaßt sich mit der Isolierung und Strukturermittlung des Hauptsaponins der Samen, das die Bezeichnung Githagosid (**1a**) erhielt und als saures monodesmosidisches Triterpenglycosid in Form des Methylesters (**1b**) rein erhalten werden konnte.



Für die Untersuchung wurden die gemahlene Samenkörner mit 50proz. Methanol erschöpfend extrahiert und der Extrakt zur Entfernung unpolarer Anteile mit Petroläther ausgeschüttelt. Wegen des stark polaren Charakters der Glycoside mußte auf die übliche Aufarbeitung durch Extraktion der Saponine aus wäßriger Lösung mit *n*-Butanol verzichtet und die Isolierung über Säulenchromatographie an Kieselgel versucht werden. Die so erhaltene chromatographisch einheitliche Fraktion, die aufgrund der Dünnschichtchromatographie als Hauptprodukt bezeichnet werden muß, wurde der sauren Hydrolyse unterworfen. Sie lieferte jedoch zwei Genine, von denen das in geringeren Mengen vorkommende durch Vergleich mit authentischem Material als Quillajasäure (β ,16 α -Dihydroxy-23-oxo- Δ^{12} -oleanen-28-säure) erkannt wurde. Das zweite, in wesentlich größerer Menge vorhandene Aglycon ließ sich durch Massenspektroskopie und über sein Acetyl- und Methylesterderivat als Gypsogenin (β -Hydroxy-23-oxo- Δ^{12} -oleanen-28-säure) identifizieren, womit die Vermutung von *Kon* und *Soper*⁷⁾ bestätigt worden ist. Die Papierchromatographie des durch Hydrolyse erhaltenen Kohlenhydratanteils zeigte, daß es sich hierbei um die Zucker Glucuronsäure, Glucose, Galactose, Fucose, Xylose und Rhamnose handelte. Da das Auftreten zweier Genine bei der Hydrolyse auf ein Gemisch hinwies, wurde eine weitere Reinigung über den Methylester angestrebt.

Hierbei zeigte sich, daß bei hohen Saponinkonzentrationen trotz eines großen Überschusses an Diazomethan keine Veresterung zu erreichen war, ein Effekt, der durch Assoziation zwischen den Glycosidmolekülen erklärbar ist. Reproduzierbare Ergebnisse erhielt man erst durch langsames Eingießen der methanolisch-wäßrigen Saponinlösung in eine Mischung aus ätherischem Diazomethan, Methanol und Wasser bei 0°C.

Der bei der Veresterung als Hauptprodukt erhaltene Githagosid-methylester (**1b**) ließ sich nunmehr durch Säulen- und Gelchromatographie rein isolieren. Nach der sauren Hydrolyse lieferte er als Aglycon allein Gypsogenin und die Zucker Glucose, Fucose, Xylose und Rhamnose. Ihre quantitative Bestimmung durch Gaschromatographie⁸⁾ über die persilylierten Methylglycoside ergab ein Verhältnis von 1:1:1:1. Damit wurde das erste Mal ein Glycosid aus dem Samen der Kornrade als Ester in reiner Form isoliert.

Um Aussagen über die Zuckerverknüpfung machen zu können, wurde **1b** nach *Hakomori*⁹⁾ permethyliert und anschließend sauer hydrolysiert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose, 2,3,4-Tri-*O*-methyl-D-xylose, 2-*O*-Methyl-L-rhamnose und 3,4-Di-*O*-methyl-D-fucose. Während sich 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose und 2,3,4-Tri-*O*-methyl-D-xylose durch Vergleich mit authentischem Material identifizieren ließen, führte bei den Methylzuckern der Rhamnose und Fucose die NMR-Spektroskopie der Acetate zur Ermittlung der Struktur. So konnte durch Spin-Entkopplungsexperimente festgestellt werden, daß in der Methylrhamnose die Methoxygruppe an das C-2 gebunden sein muß. Der anschließende Vergleich der physikalischen Daten dieses Methylzuckers und des Anilids mit Angaben der Literatur bestätigte die Annahme, daß es sich um die 2-*O*-Methyl-L-rhamnose handelte.

Das NMR-Spektrum der acetylierten Methylfucose zeigte ein Dublett $\tau = 3.72$ ($J = 3.7$ Hz), das dem Proton an C-1 zuzuordnen ist. Das Proton an C-2 ergab ein Quartett $\tau = 4.67$, das sich bei Einstrahlung der Absorptionsfrequenz von 1-H zu einem Dublett mit $J = 10.3$ Hz vereinfachte. Mit dem Schwerpunkt $\tau = 5.96$ sind als schlecht aufgelöstes Multiplett die Signale des 5-H zu erkennen. Bei Einstrahlung von dessen mittlerer Absorptionsfrequenz vereinfachte sich das Dublett ($\tau = 8.71$, $J = 6.4$ Hz) der drei Protonen an C-6 zu einem Singulett. Zwischen $\tau = 6.28$ und 6.75 sind in einem unübersichtlichen Multiplett der Protonen an C-3 und C-4 die beiden Signale der Methoxygruppen $\tau = 6.38$ und 6.50 zu sehen. Die Signale der Acetylgruppen haben $\tau = 7.86$ und 7.95 . Die signifikant größere chemische Verschiebung des Protons an C-2 gegenüber den Protonen an C-3, C-4 und C-5 beweist, daß die zweite Acetylgruppe an die Hydroxygruppe am C-2 gebunden sein muß. Die geringe Kopplungskonstante ($J = 3.7$ Hz) des Dubletts von 1-H weist auf die α -Konfiguration hin, wie sich auch aus dem Vergleich der Drehwerte der beiden Acetate ablesen läßt. Die große Kopplungskonstante von $J = 10.3$ Hz, die nach dem Einstrahlen der Absorptionsfrequenz von 1-H für das Dublett von 2-H gemessen wird, deutet auf die *trans*-axiale Stellung der Protonen an C-2 und C-3 hin.

Während in der Literatur nur die Daten der 3,4-Di-*O*-methyl-L-fucose zu finden sind, weist der vorliegende Methylzucker einen Drehwert mit entgegengesetztem Vorzeichen auf. Dies spricht für die Zugehörigkeit zur D-Reihe. Zum Beweis wurde die 3,4-Di-*O*-methylfucose nach *Kuhn*¹⁰⁾ permethyliert und in das 2,3,4-Tri-*O*-methylderivat übergeführt, dessen Drehwert mit den Angaben der Literatur über die 2,3,4-Tri-*O*-methyl-D-fucose übereinstimmt.

Das Auftreten der 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose und der 2,3,4-Tri-*O*-methyl-D-xylose zeigt eine verzweigte Zuckerkette mit Glucose und Xylose als endständige Zucker an. Die Verzweigung selbst liegt an der Rhamnose, wie sich aus dem Auftreten der 2-*O*-Methyl-L-rhamnose ergibt.

⁸⁾ G. Wulff, J. Chromatogr. **18**, 285 (1965).

⁹⁾ S. Hakomori, J. Biochem. **55**, 205 (1964) [C. A. **60**, 15959 (1964)].

¹⁰⁾ R. Kuhn, I. Löw und H. Trischmann, Chem. Ber. **90**, 203 (1957).

Um zu weiteren Aussagen über den Aufbau des Kohlenhydratteils und die Stellung der Fucose zu kommen, mußte die Zuckerkette partiell abgebaut werden. Die Oxidation von **1b** mit Perjodat¹¹⁾ führt zur Spaltung zwischen den Kohlenstoffbindungen benachbarter Hydroxylgruppen unter Bildung der entsprechenden Aldehyde. Die nach der Reduktion mit Natriumborhydrid entstehende acetalähnliche Verbindung ist sehr säureempfindlich und kann mit stark verdünnten Mineralsäuren bei niedriger Temperatur unter Bedingungen gespalten werden, bei denen keine Hydrolyse des ursprünglichen Saponins eintritt.

Da die Permethylierung ergeben hatte, daß bis auf die Rhamnose alle Zucker freie vicinale Hydroxylgruppen haben, durfte nach der Hydrolyse nur noch Rhamnose nachweisbar sein. Ist dieser Zucker direkt an das Aglycon gebunden, so wird er nicht abgespalten und sollte sich zusammen mit dem Genin isolieren lassen. Wenn sich jedoch die Fucose am Aglycon befindet, muß die Rhamnose im polareren Hydrolysat auftreten.

Durch Ausschütteln des Hydrolysegemisches mit Chloroform erfolgte Auftrennung in eine polare und eine unpolare Phase. Die Untersuchung der beiden Fraktionen ergab, daß sich nur das Aglycon im Chloroform-Auszug nachweisen ließ, während die wäßrige Phase Rhamnose enthielt.

Dieses Ergebnis konnte ferner durch enzymatische Abbauprobe an **1b** mit einem Enzymgemisch aus *Aspergillus wentii* bestätigt werden. Hierbei entstehen zwei Spaltprodukte, von denen das erste Gypsogenin und Fucose, das zweite Gypsogenin, Fucose und Rhamnose enthält.

Die Spaltung mit Enzymgemischen führte in der Regel zum freien Aglycon oder lieferte noch Spaltstücke mit dem Genin und einem oder zwei Zuckern. Um ein Spaltstück mit drei Zuckern (Genin, Fucose, Rhamnose und Xylose) zu erhalten, gab man einen großen Überschuß an Xylose und Rhamnose zusammen mit **1b** zur Enzymlösung, um im Sinne einer kompetitiven, bzw. kumulativen Hemmung den Abbau dieser Zucker vom Glycosid zu unterdrücken. Die Dünnschichtchromatographie zeigte nach einem Tag, daß die vorher vorwiegend gebildeten unpolaren Bruchstücke (Aglycon, bzw. Aglycon mit einem Zucker) kaum feststellbar waren. Statt dessen entstanden Spaltprodukte, die das Genin mit zwei Zuckern und das sonst nicht isolierbare Teilstück mit drei Zuckern darstellten. Diese Methode dürfte auch in analogen Fällen erfolgreich angewandt werden können.

Nach der Bestimmung der Reihenfolge der Zucker blieb noch die Verknüpfung der endständigen Glucose und Xylose mit der Rhamnose zu ermitteln. *Kawasaki*¹²⁾ gelang es, Xylose selektiv durch vorsichtige Hydrolyse mit einem Gemisch aus verdünnter wäßriger Salzsäure und Äthanol aus entsprechenden Glycosiden abzuspalten. Nachdem eine Probehydrolyse mit kleinen Mengen **1b** wie erwartet nur Xylose als freien Zucker lieferte, wurde unter den gleichen Bedingungen eine größere Menge eingesetzt. Jedoch zeigten sich jetzt neben Spuren der aus den Enzymspaltungen bekannten unpolaren Substanzen zwei Hauptprodukte, die polarer als die Ausgangsverbindung **1b** waren. Nach Isolierung, Hydrolyse und papierchromatographischer Untersuchung ließen sich in beiden Substanzen Glucose, Xylose, Fucose und Rhamnose nachweisen.

¹¹⁾ J. J. Goldstein, G. W. Hay, B. A. Lewis und F. Smith, *Methods Carbohydrate Chem.* **5**, 361 (1965).

¹²⁾ T. Kawasaki, *Tetrahedron* **21**, 299 (1965).

Offensichtlich spaltete die Zuckerkette von **1b** direkt am Aglycon ab, wobei daneben auch das Äthylglycosid des Tetrasaccharids entstand. Dies wurde dadurch bestätigt, daß nur das polare Produkt sich mit Anilinphthalat anfärbte und der zweite Fleck erst nach dem Ansprühen der Dünnschichtplatte mit verdünnter Schwefelsäure sichtbar wurde.

Beide Tetrasaccharide wurden daraufhin vereinigt und erneut der Hydrolyse nach *Kawasaki* so lange unterworfen, bis sich dünn-schichtchromatographisch keine Ausgangsprodukte mehr nachweisen ließen. Anschließend methylierte man das gesamte Hydrolysegemisch mit Methyljodid und Silberoxid in Dimethylformamid¹⁰⁾. Die Permethylierungsprodukte trennte man durch Säulenchromatographie auf und untersuchte sie nach üblicher saurer Hydrolyse.

Hierbei erhielt man eine Fraktion, die aus 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose und 2,4-Di-*O*-methyl-L-rhamnose bestand, wie durch Vergleich mit authentischem Material sichergestellt werden konnte. Damit ist bewiesen, daß die Glucose am C-3 und die Xylose am C-4 der Rhamnose gebunden sind.

Die Konfigurationsbestimmung der glycosidischen Bindung der Glucose ließ sich nicht durchführen, da wegen der verzweigten Zuckerkette die beschaffbaren α - bzw. β -Glucosidasen nicht einwirkten. Die Formulierung der Bindungen an den anomeren C-Atomen stützt sich daher auf Analogieschlüsse.

Damit ergibt sich für Githagosid (**1a**) folgende Struktur: 3-*O*-[β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3_{Rham})- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4_{Rham})- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2_{Fuc})- β -D-fucopyranosyl]-3 β -hydroxy-23-oxo- Δ ¹²-oleanen-28-säure.

Nebenglycoside mit Quillajasäure, bzw. den Zuckern D-Glucuronsäure und D-Galactose konnten bisher nicht rein erhalten werden.

Da die Giftigkeit des Kornradensamens bisher dem Saponinanteil zukommen sollte³⁾, wurden toxikologische Untersuchungen mit dem eingangs erwähnten Saponingemisch an weißen Mäusen ausgeführt. Perorale Verabreichung ergab eine LD 50 von 750 mg/kg. Diese geringe Toxizität liegt im Bereich der peroral als weitgehend ungiftig bekannten Saponine und kann nicht zu den Vergiftungen geführt haben. In einem weiteren Test verabreichte man fein gemahlenes Kornrademehl bis zu einer Dosis von 8000 mg/kg, ohne daß Vergiftungserscheinungen auftraten. Möglicherweise hatte der Giftstoff durch lange Lagerzeit der Samen seine Wirksamkeit weitgehend verloren. Weiteren Arbeiten an frischem Material muß es vorbehalten bleiben, die Ursache der Toxizität von Kornradensamen zu ermitteln.

Mikrobiologische Untersuchungen im Plättchentest bei den Pilzen *Trichoderma viride* und *Neurospora crassa* erbrachten lediglich beim Saponingemisch Hemmzonen von 2, bzw. 6,5 mm, während Githagosid-methylester (**1b**) keine Aktivität zeigte.

Die hämolytische Wirksamkeit des Saponingemisches lag bei 50 μ g/ml, während Githagosid-methylester (**1b**) selbst bei 500 μ g/ml keine Hämolyse zeigte und somit als inaktiv anzusehen ist. Eine Erklärung hierfür bieten die Ergebnisse von *Schlösser* und *Segal*¹³⁾. Demnach erfolgt die Hämolyse nur durch das freie Aglycon, das durch Enzyme der Membran der Erythrozyten aus den Saponinen in Freiheit gesetzt wird. Da die D-Fucose direkt an das Aglycon

¹³⁾ E. Schlösser und R. Segal, Role of β -glycosidases in the antifungal activity of saponins (in Vorbereitung).

gebunden ist und D-Fucosidasen an den Erythrozytenmembranen wohl nicht vorkommen, kann keine vollständige Hydrolyse des Saponins bis zum Aglycon erfolgen und somit sollte auch keine Hämolyse stattfinden.

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 H. Schulze), Herrn Prof. Dr. R. Domenjoz für die Durchführung der toxikologischen Untersuchungen, Herrn Prof. Dr. G. Legler für die Überlassung der Enzympräparate, Herrn Prof. Dr. E. Schlösser für die Bestimmung der hämolytischen Aktivität und Herrn Prof. Dr. F. Schönbeck für die Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch nach Kofler-Weygand, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Die IR-Spektren ermittelte man mit dem Spektrometer Perkin-Elmer, Modell 221, die Protonenresonanzspektren mit dem Gerät Spektrospin HX 90 und die Massenspektren mit dem Gerät CH 4 der Atlas-MAT-GmbH. Die C,H,N-Analysen führte das Mikroanalytische Laboratorium Dr. F. Pascher, Bonn, aus. Die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Merck) erfolgte nach den üblichen Methoden¹⁴⁾. Angesprüht wurde mit 30proz. Schwefelsäure oder mit Anilinphthalat in wassergesättigtem n-Butanol¹⁵⁾. Zur Papierchromatographie diente das Papier Whatman Nr. 1, die Chromatogramme wurden absteigend entwickelt. Zur Säulenchromatographie benutzte man das Kieselgel (Korngröße 0.063–0.100 mm) der Firma Woelm.

Für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie kamen folgende Fließmittelsysteme zur Anwendung: A: Chloroform/Methanol/Wasser (65:35:10)¹⁶⁾, B: Chloroform/Methanol/Wasser (65:30:5), C: Methylchlorid/Methanol/Wasser (65:30:5), D: n-Butanol/Äthanol/Wasser (8:1:10), E: n-Butanol/Äthanol/Wasser (4:1:5)¹⁷⁾, F: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5), G: Methylchlorid/Methanol (49:1), H: Petroläther (30–50°C)/Aceton (50:1), I: Chloroform/Methanol/Wasser (74:23:3), K: Methylchlorid/Methanol (48:2), L: Chloroform/Methanol/Aceton (3:2:2), M: Chloroform/Methanol/Wasser (90:9:0.2), N: Benzol/Aceton (5:1), O: Chloroform/Methanol/Wasser (90:9:0.1), P: Diisopropyläther/Methanol (10:1), Q: Petroläther (30–50°C)/Aceton (15:1), R: Benzol/Aceton (2:1), S: Petroläther (60–90°C)/Aceton (1:1).

Fließmittelsysteme für die Papierchromatographie: T: Pyridin/Essigester/Wasser (1:3.6:1.15)¹⁸⁾, U: Pyridin/Essigester/Wasser/Eisessig (5:5:3:1)¹⁹⁾, V: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1), W: n-Butanol/Butanon, gesättigt mit Boratpuffer (1:1)²⁰⁾.

Zur Gaschromatographie benutzte man das Gerät F7 von Perkin-Elmer mit Integrator D2 und Kienzle Digitaldrucker. Als Detektor diente ein Flammenionisationsdetektor. Trägergas war Helium bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 22.2 ml/min. Der Einspritzblock wurde auf 250°C, der Detektor auf 240°C und der Säulenofen auf 200°C geheizt.

Zu den enzymatischen Spaltungen benutzte man Enzymgemische aus *Aspergillus wentii*, β -Glucosidase (Emulsin), sowie α -Glucosidase aus Hefe, bzw. *Aspergillus niger*.

¹⁴⁾ R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

¹⁵⁾ Organikum, 8. Aufl., S. 618, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1968.

¹⁶⁾ T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. Pharm. Bull. **11**, 1564 (1963).

¹⁷⁾ A. J. Khorlin, L. V. Bakinorskii, V. E. Vaskorskii, A. G. Venjaminora und J. S. Ovodov, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. Nauk **1963**, 2008 [C. A. **60**, 8113 (1964)].

¹⁸⁾ P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirota, G. Ruffini und A. Sartori, J. Chromatogr. **3**, 343 (1960).

¹⁹⁾ F. F. Fischer und H. Dörfel, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **301**, 224 (1955).

²⁰⁾ M. T. Kraus, H. Jäger, O. Schindler und T. Reichstein, J. Chromatogr. **3**, 63 (1960).

Isolierung der Saponine: Jeweils 1 kg getrocknete Samen wurden gemahlen und fünfmal mit 3 Liter 50proz. Methanol extrahiert. Die dabei entstandene, nicht filtrierbare Suspension wurde zentrifugiert und der klare Überstand am Rotationsverdampfer auf 1.5 Liter eingengt. Zur Entfernung der unpolaren Anteile schüttelte man diese Lösung mit 0.4 Liter Petroläther (60–90°C) dreimal aus. Nach dem Eindampfen der wäbr. Phase, wegen der starken Schaumbildung mußte dies unter Zufügen von n-Butanol erfolgen, erhielt man 96 g eines braunen Materials, das neben anderen Produkten im Dünnschichtchromatogramm in den Systemen A und B bei $R_F = 0.1$ einen sehr starken Fleck lieferte. Zur weiteren Auftrennung wurde auf 200 g Kieselgel aufgezogen und an 2 kg Kieselgel im System C chromatographiert. Der Austausch des CHCl_3 im System B gegen CH_2Cl_2 bewirkte eine starke Erhöhung der R_F -Werte der unpolaren Anteile, während die Substanz mit $R_F = 0.1$ keine Änderung der Laufstrecke erfuhr und so besser abgetrennt werden konnte. Man erhielt 10 g eines farblosen Materials, das im System D an Kieselgel (Verhältnis 1 : 100) weiter gereinigt wurde. Schließlich ergaben sich 7 g eines in den Systemen A bis F nicht weiter auftrennbaren Materials.

Isolierung der Aglycone: 10 g des so gereinigten Extraktes wurden in 60 ml 5proz. methanol. Salzsäure 6 h unter Rückfluß gekocht, danach wurde der Ansatz mit der dreifachen Menge Wasser versetzt und der ausgefallene Niederschlag (2.5 g) abfiltriert. Nach der Trennung an 300 g Kieselgel im System G erhielt man 186 mg Gypsogenin und 40 mg Quillajasäure.

Acetylgypsogenin: 50 mg Gypsogenin wurden in 4 ml Pyridin mit 4 ml Acetanhydrid und 0.5 mg 4-(Dimethylamino)pyridin²¹⁾ versetzt. Nach 12 h bei Raumtemp. arbeitete man durch Eingießen in Eiswasser, Abnutschen und Waschen des ausgefallenen Niederschlages auf und reinigte ihn durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule im System G. Kristallisation aus Methanol. Schmp. 181–183°C, $[\alpha]_D^{20} = +78^\circ$ ($c = 0.95$, CHCl_3) (Lit.²²⁾ Schmp. 177°C, $[\alpha]_D^{20} = +78^\circ$ (CHCl_3)).

Acetylgypsogenin-methylester: 100 mg Gypsogenin wurden in 20 ml Methanol mit 500 mg Kaliumcarbonat und 5 ml Methyljodid²³⁾ 2 d bei Raumtemp. gerührt, danach wurde der Ansatz eingedampft und der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen. Die wäbr. Lösung schüttelte man dreimal mit 50 ml CHCl_3 aus, wusch die organische Phase mit Wasser und zog das Lösungsmittel ab. Anschließend acetylierte man den Gypsogenin-methylester und arbeitete wie üblich auf. Die Reinigung erfolgte an einer Kieselgelsäule im System H und ergab 45 mg Acetylgypsogenin-methylester. Schmp. 188–191°C, $[\alpha]_D^{20} = +79^\circ$ ($c = 0.569$, CHCl_3) (Lit.⁷⁾ Schmp. 191°C, $[\alpha]_D^{20} = +80^\circ$ (CHCl_3)).



Diacetylquillajasäure: 40 mg Quillajasäure wurden wie üblich acetyliert und aufgearbeitet. Die Kristallisation erfolgte aus wäbr. Methanol. Schmp. 178–180°C, $[\alpha]_D^{20} = +3.75^\circ$ ($c = 0.64$, CHCl_3) (Lit.²⁴⁾ Schmp. 180°C, $[\alpha]_D^{20} = +4^\circ$ (CHCl_3)).

Identifizierung der Zucker: 1.0 g des gereinigten Extraktes wurde in 30 ml 5proz. methanol. Salzsäure 4 h unter Rückfluß erhitzt, anschließend mit 60 ml Wasser versetzt und der entstandene Niederschlag abgetrennt. Am Rotationsverdampfer zog man das Lösungsmittel bis auf 20 ml ab, gab dann zur Hydrolyse der Methylglycoside 5proz. wäbr. Salzsäure hinzu und erhitze 2 h auf 100°C. Die Neutralisation erfolgte mit Silbercarbonat. Die Papierchromatographie dieses Zuckergemisches in den Systemen T, U, V und W führte zur Identifizierung von Glucuronsäure, Glucose, Galactose, Fucose, Xylose und Rhamnose.

²¹⁾ W. Steglich und G. Höfle, Angew. Chem. **81**, 1001 (1969); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **8**, 981 (1969).

²²⁾ L. Ruzika und G. Giacomello, Helv. Chim. Acta **19**, 1136 (1936).

²³⁾ R. Segal und A. Taube, Tetrahedron **29**, 675 (1973).

²⁴⁾ R. Tschesche und G. Wulff, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Bd. 30, S. 512, Springer-Verlag, Wien 1973.

Veresterung: Eine äther. Diazomethanlösung (180 ml) aus 0.1 mol *p*-Toluolsulfonylmethylnitrosamid mischte man im Eisbad mit 60-ml Wasser und 250 ml Methanol. Unter Rühren wurde bei 0°C eine Mischung aus 5.0 g des gereinigten Extraktes in 30 ml Wasser und 100 ml Methanol langsam in die Diazomethanlösung eingetragen. Nach 4 h konnte am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel abgezogen werden. Das bei der Veresterung entstandene, im DC-System A bei $R_F = 0.4$ liegende Hauptprodukt **1b** isolierte man durch Säulenchromatographie (System I). Gelfiltration an Sephadex G-25 mit Wasser als Elutionsmittel, Abdampfen der entsprechenden Fraktionen und Trocknen des Rückstandes i. Vak. ergab 311 mg einheitliches, nicht kristallisierendes **1b** als amorphes farbloses Pulver. Erweichungspunkt ab 228°C, $[\alpha]_D^{20} = -20.8^\circ$ (Pyridin).



Hydrolyse von 1b: 30 mg **1b** wurden wie üblich mit 5proz. methanol. Salzsäure hydrolysiert, danach wurde der Ansatz mit der doppelten Menge Wasser versetzt und das ausgefallene Aglycon abfiltriert. Dünnschichtchromatographischer Vergleich (System K) mit authent. Material zeigte, daß es sich um Gypsogenin handelte.

Das Filtrat wurde auf 10 ml eingengt, mit 20 ml 5proz. wäbr. Salzsäure versetzt und 2 h unter Rückfluß gekocht. Nach Neutralisation mit Silbercarbonat ließen sich in der Lösung papierchromatographisch (Systeme T, U und V) Glucose, Fucose, Xylose und Rhamnose nachweisen.

Quantitative Zuckerbestimmung⁸⁾: 20 mg **1b** wurden wie üblich mit methanol. Salzsäure hydrolysiert. Nach Neutralisation mit Silbercarbonat versetzte man den Ansatz mit Wasser, filtrierte und dampfte das Filtrat ein. Die so erhaltenen Methylglycoside setzte man mit Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan in Pyridin zu den Silylverbindungen um. Die gaschromatographische Bestimmung ergab ein molares Verhältnis der vier Zucker Glucose, Fucose, Xylose und Rhamnose von 1:1:1:1.

Permethylierung⁹⁾ von **1b**: 1.0 g **1b** wurde in 50 ml wasserfreiem Dimethylsulfoxid mit 2 g gepulvertem Natriumhydrid versetzt. Nach 2 h gab man 50 ml Methyljodid hinzu. Die Zugabe von 500 mg Natriumhydrid und 2 ml Methyljodid wiederholte man alle 12 h im Zeitraum von 4 d. Danach goß man das Reaktionsgemisch in Wasser und extrahierte das permethylierte Produkt mit $CHCl_3$. Die organische Phase wurde zur Entfernung des Dimethylsulfoxids 10mal mit Wasser gewaschen und dann zur Trockne eingengt. Säulenchromatographie an 100 g Kieselgel im System N ergab 290 mg permethyliertes **1b**, das im IR-Spektrum keine OH-Bande aufwies.

Hydrolyse von permethyliertem 1b: 290 mg permethyliertes **1b** spaltete man in der üblichen Weise mit methanol. und wäbr. Salzsäure und arbeitete auf. Die Trennung des so erhaltenen Methylzuckergemisches erfolgte an 200 g Kieselgel mit Benzol/Aceton-Gemischen steigender Polarität (10:1, 10:2, 10:4, 10:5) und ergab 20 mg 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*D*-xylose, 24 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose und 51 mg eines Gemisches aus 3,4-Di-*O*-methyl-*D*-fucose und 2-*O*-Methyl-*L*-rhamnose. Die weitere Auftrennung gelang an 10 g Kieselgel im System O und brachte 21 mg 3,4-Di-*O*-methyl-*D*-fucose und 18 mg 2-*O*-Methyl-*L*-rhamnose. Die Identifizierung der Methylzucker geschah wie folgt:

2,3,4-Tri-*O*-methyl-*D*-xylose: Schmp. 89–91°C (aus Äther/Petroläther), $[\alpha]_D^{20} = +38^\circ \rightarrow +18.5^\circ$ ($c = 0.56$, Wasser) (Lit.²⁵⁾ Schmp. 91–92°C, $[\alpha]_D^{20} = +64^\circ \rightarrow +18^\circ$ (Wasser)). Die Substanz erwies sich nach Misch-Schmp. und chromatographischem Verhalten (Systeme M, N, P und T) als identisch mit authent. Material.

²⁵⁾ R. A. Laidlaw und E. G. V. Percival, Advan. Carbohyd. Chem. 7, 29 (1952).

2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose: Schmp. 92–94°C (aus Petroläther), $[\alpha]_D^{20} = +90^\circ \rightarrow +83.5^\circ$ ($c = 0.72$, Wasser) (Lit.²⁶ Schmp. 96°C, $[\alpha]_D^{20} = +92^\circ \rightarrow +84^\circ$ (Wasser)). Die Verbindung erwies sich nach Mischprobe und chromatographischem Verhalten (Systeme M, N, P und T) als identisch mit authent. Material.

3,4-Di-O-methyl-D-fucose: Schmp. 97–99°C (aus Benzol/Aceton), $[\alpha]_D^{20} = +134^\circ \rightarrow +106^\circ$ ($c = 0.496$, Wasser).

Acetylierung der 3,4-Di-O-methyl-D-fucose: 21 mg des Methylzuckers gab man mit etwas 4-(Dimethylamino)pyridin in 2 ml Pyridin und 2 ml Acetanhydrid. Nach Stehenlassen über Nacht bei Raumtemp. und üblicher Aufarbeitung erhielt man ein Gemisch der α - und β -Acetate, das sich an 3 g Kieselgel im System Q trennen ließ.

1,2-Diacetyl-3,4-di-O-methyl- α -D-fucose (Sirup, 12 mg): $[\alpha]_D^{20} = +110.4^\circ$ ($c = 0.48$, CHCl_3). — ¹H-NMR (CDCl_3): Siehe S. 2712.

1,2-Diacetyl-3,4-di-O-methyl- β -D-fucose (4 mg): Schmp. 174°C (aus Methanol), $[\alpha]_D^{20} = +31.4^\circ$ ($c = 0.35$, CHCl_3).

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_7$ (290.3) Ber. C 53.79 H 7.64 Gef. C 53.49 H 7.15

Permethylierung¹⁰⁾ der 3,4-Di-O-methyl-D-fucose: 10 mg 3,4-Di-O-methyl-D-fucose wurden in 5 ml Dimethylformamid mit 50 mg Silberoxid²⁷⁾ und 2 ml Methyljodid versetzt und der Ansatz 1 d bei Raumtemp. gerührt. Zur Aufarbeitung goß man CHCl_3 in die Reaktionslösung, bis kein weiteres $[\text{N}(\text{CH}_3)_4]\text{J} \cdot 2 \text{AgJ}$ mehr ausfiel. Nach 3 h ließ sich der grob kristalline Niederschlag abfiltrieren. Die CHCl_3 -Phase wurde dreimal mit Kaliumcyanidlösung ausgeschüttelt, anschließend fünfmal mit reinem Wasser gewaschen und dann zur Trockene gebracht. Das so erhaltene Methylglycosid hydrolysierte man wie üblich mit wäbr. Salzsäure. Nach Reinigung an Kieselgel (System R) verblieben 0.9 mg **2,3,4-Tri-O-methyl-D-fucose:** $[\alpha]_D^{20} = +105^\circ$ ($c = 0.09$, Wasser) (Lit.²⁸) $[\alpha]_D^{20} = +106^\circ$ (Wasser).

2-O-Methyl-L-rhamnose (Sirup): $[\alpha]_D^{20} = +22^\circ$ ($c = 0.69$, Wasser) (Lit.²⁸) $[\alpha]_D^{20} = +24^\circ$ (Wasser).

Acetylierung der 2-O-Methyl-L-rhamnose: 30 mg des Methylzuckers wurden wie üblich in Pyridin mit Acetanhydrid acetyliert und aufgearbeitet. Nach Trennung an 5 g Kieselgel (System Q) ergaben sich 30 mg **1,3,4-Triacetyl-2-O-methyl- β -L-rhamnose**.

¹H-NMR (CDCl_3): $\tau = 8.74$ (d, $J = 6.3$ Hz, CH_3), 7.83, 7.88 und 7.93 (s, 3 CH_3CO), 6.49 (s, CH_3O), 6.36 (mc, 2-H), 6.08 (mc, 5-H), 4.80 (mc, 3-H, 4-H), 3.83 (d, $J = 2$ Hz, 1-H).

2-O-Methyl-L-rhamnose als Anilid: Zu einer Lösung von 17 mg des Methylzuckers in 2 ml absol. Methanol fügte man 0.05 ml Anilin und 2 mg Ammoniumchlorid hinzu und erhitze 2 h unter Rückfluß. Nach Verdünnen mit Wasser schüttelte man dreimal mit 50 ml CHCl_3 aus. Die weitere Reinigung erfolgte an Kieselgel im System N und ergab 17 mg **2-O-Methyl-L-rhamnose-anilid:** Schmp. 153–155°C (aus Äther), $[\alpha]_D^{20} = +43.5^\circ$ ($c = 0.492$, Pyridin) (Lit.²⁹) Schmp. 152°C, $[\alpha]_D^{20} = +43^\circ$ (Pyridin).

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ (254.3) Ber. C 61.43 H 7.87 N 5.51 Gef. C 61.85 H 7.53 N 5.54

Perjodat-Spaltung¹¹⁾: 208 mg **1b** wurden mit 40 ml 0.1 N NaJO_4 versetzt. Nach 6 h bei Raumtemp. zerstörte man das überschüssige Perjodat durch Zugabe von 500 mg Äthylenglycol, nach 4 h gab man dann zur Reduktion der Aldehyde 500 mg Natriumborhydrid hinzu.

²⁶⁾ J. C. Irvine und J. W. H. Oldham, J. Chem. Soc. **119**, 1744 (1921).

²⁷⁾ B. Helferich, Liebigs Ann. Chem. **450**, 219 (1926).

²⁸⁾ G. G. Maher, Advan. Carbohyd. Chem. **10**, 257 (1955).

²⁹⁾ P. Andrews, L. Hough und J. K. N. Jones, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 125 (1955).

Nach Stehenlassen über Nacht wurde mit verd. Essigsäure neutralisiert, der Ansatz bis zur Trockene eingedampft und zur Entfernung der Borsäure mehrmals mit Methanol abgedampft. Der trockene Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und das Reaktionsprodukt mit *n*-Butanol extrahiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels versetzte man mit 40 ml Wasser und säuerte mit verd. Salzsäure auf pH 1 an. Nach 2 h im Wasserbad bei 50°C war die Hydrolyse vollständig (Kontrolle mit DC). Durch Ausschütteln mit CHCl_3 konnten die Hydrolysenprodukte in einen polaren und unpolaren Anteil getrennt werden. Die CHCl_3 -als auch die Wasser-Phase wurden eingedampft und jeweils mit 5proz. wäbr. Dioxan/Salzsäure-Lösung 1 h bei 100°C hydrolysiert. Nach Neutralisation mittels Ionenaustauscher (Dowex 3) zeigten DC im System L und Papierchromatographie im System V, daß in der wäbr. Phase lediglich Rhamnose als Zucker auftrat.

Enzymatische Spaltung von 1b: 50 mg **1b** wurden in 20 ml Wasser (pH 5) mit einem Enzymgemisch aus *Aspergillus wentii* versetzt und der Ansatz 1 d im Brutschrank bei 39°C gehalten. Danach zeigten sich mit DC (System I) neben **1b** vier unpolare Bruchstücke, von denen sich das unpolarste A als identisch mit Gypsogenin erwies. Nach Denaturierung der Enzyme mit 40 ml Methanol und kurzem Aufkochen ließen sich durch Säulenchromatographie die ersten drei Substanzen A, B und C rein erhalten, während die vierte in zu geringen Mengen anfiel. Nach der üblichen sauren Hydrolyse erkannte man anhand der Dünnschicht- (System I) und Papierchromatographie (System V), daß die Flecke aus den Fraktionen B und C aus Gypsogenin und Fucose, bzw. Gypsogenin, Fucose und Rhamnose bestanden.

Ferner konnte festgestellt werden, daß bei Zugabe eines großen Überschusses an freier Xylose und Rhamnose die Bildung der beiden unpolaren Substanzen unterdrückt wird, während gleichzeitig die zwei polaren Bruchstücke als Hauptprodukt hervortraten.

Partialhydrolyse von 1b: 400 mg **1b** wurden in 80 ml einer Mischung aus 0.2 N HCl in 50proz. Äthanol 1 h bei 100°C gehalten¹²). DC im System A zeigte als Hauptprodukte bei $R_F = 0.25$ und $R_F = 0.1$ zwei Substanzen, die nach Neutralisation mit Silbercarbonat in Ausbeuten von 37 mg bzw. 72 mg erhalten werden konnten. Chromatographischer Vergleich (System L) stellte sicher, daß beide Produkte keine freien Monosaccharide enthielten. Die saure Hydrolyse einer Probe der beiden Substanzen mit anschließender Papierchromatographie (System V) zeigte in beiden Fällen die Anwesenheit von Glucose, Fucose, Xylose und Rhamnose. Da sich das freie Tetrasaccharid, bzw. das entsprechende Äthylglycosid bei der Hydrolyse gebildet hatte, wurden beide Substanzen zusammengegeben und erneut für 3.5 h in einer Mischung aus 0.4 N HCl in 50proz. Äthanol auf 100°C erhitzt. Anschließend neutralisierte man wie üblich, filtrierte und engte die Lösung bis zur Trockene ein. Das Zuckergemisch wurde in 8 ml Dimethylformamid mit 2 ml Methyljodid und 1 g Silberoxid in 3 d bei Raumtemp. permethyliert und wie üblich durch Versetzen mit CHCl_3 , Filtration, Waschen mit Kaliumcyanidlösung und Wasser aufgearbeitet. Die Permethylierungsprodukte trennte man an 10 g Kieselgel mit Benzol/Aceton-Gemischen steigender Polarität (20:1, 10:1, 5:1). Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen durch saure Hydrolyse und DC ergab bei einer Probe die Anwesenheit von 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose und 2,4-Di-*O*-methyl-*L*-rhamnose. Durch chromatographischen Vergleich (Systeme I, M, N und S) mit authent. Material an 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose, 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*D*-xylose, 2,4-Di-*O*-methyl-*L*-rhamnose und 2,3-Di-*O*-methyl-*L*-rhamnose konnte dieses Ergebnis sowohl über die R_F -Werte als auch durch die Anfärbung mit Anilinphtalalat gesichert werden.