

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

## Capsicosid, ein bisdesmosidisches 22-Hydroxyfurostanol-Glycosid aus dem Samen von *Capsicum annuum* L.

Rudolf Tschesche\* und Hardo Gutwinski

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

Eingegangen am 16. Juli 1974

---

Aus dem Samen des Gewürzpaprikas (*Capsicum annuum* L.) wurde als Hauptglycosid das bisdesmosidische Furostanol-Glycosid Capsicosid (**2a**) isoliert. Enzymatische Spaltung von **2a** führte unter Abspaltung von 1 mol D-Glucose und Cyclisierung der Seitenkette im Aglycon zum Capsicosin (**1**), einem Spirostanolderivat. Die Permethylierung, Spaltung und Identifizierung der gebildeten Methylzucker aus **1** und **2a** bzw. **2b** sowie die Ergebnisse von Partialhydrolyse und das enzymatische Verhalten ergaben die Struktur der Zuckerketten an C-3 und C-26 in **2a** und als Aglycon von **1** Gitogenin.

Steroid Saponins with More than One Sugar Chain, X<sup>1)</sup>

Capsicosid, a Bisdesmosidic 22-Hydroxyfurostanol Glycoside of *Capsicum annuum* L.

From the seeds of *Capsicum annuum* L. the main glycoside capsicosid (**2a**), a bisdesmosidic furostanol glycoside, was isolated. Enzymatic hydrolysis of **2a** gave one mole of D-glucose and capsicosin (**1**), a spirostanol derivative formed by spontaneous cyclisation of the side chain of the aglycone. Permethylation of **1** and **2a** or **2b**, subsequent cleavage and identification of the methylated sugars obtained together with the results of partial hydrolysis and the enzymatic behaviour of **1** and **2a** or **2b** established the structure of the sugar chains at C-3 and C-26 in **2a** and led to the identification of the aglycone of **1** as gitogenin.

---

1963 beschrieb *I. Gal* die Isolierung von Capsicidin, einer gegen Bakterien und Hefe wirksamen Substanz, die sie aus dem Samen von *Capsicum annuum* L. erhalten hatte<sup>2)</sup>. Da die für Saponine üblichen Reaktionen wie Cholesterinkomplexbildung, Hämolyse und Schaumbildungsvermögen positiv ausfielen, vermutete sie das Vorliegen eines Steroidsaponins; derartige Glycoside sind als Inhaltsstoffe für die Familie der Solanaceen typisch. 1966 bestätigte *I. Gal* ihre frühere Vermutung<sup>3)</sup> und stellte weiter fest, daß Capsicidin keine einheitliche Verbindung ist, sondern ein Gemisch aus mehreren Komponenten. Die von Frau *Gal* postulierte Diosgeninstruktur konnte mit unserem Material nicht bestätigt werden.

Die nachfolgende Arbeit befaßt sich mit der Isolierung und Strukturermittlung des Hauptglycosids der Samen von *Capsicum annuum* L., das zu den bisdesmosidischen

<sup>1)</sup> IX. Mittel.: R. Tschesche, A. M. Javellana und G. Wulff, Chem. Ber. 107, 2828 (1974).

<sup>2)</sup> *I. Gal*, Z. Lebensm.-Unters. -Forsch. 124, 333 (1964).

<sup>3)</sup> *I. Gal*, Z. Lebensm.-Unters. -Forsch. 132, 82 (1966).

Furostanolderivaten gehört und Capsicosid genannt wurde (**2a**) — ca. 0.3% der Samen. Die Substanz von *Gal* dürfte das enzymatische Spaltprodukt vom Spirostanoltyp gewesen sein.

Für die Untersuchung wurden die Samenkörner mit Sand vermischt, anschließend gemahlen und mit 80proz. Methanol extrahiert; unpolare Anteile entfernte man durch Ausschütteln mit Petroläther. Die Auftrennung in ein gut wasserlösliches Haupt- und zwei ebensolche Nebenglycoside erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser als Laufmittel. Das eingehender untersuchte Hauptprodukt bestand, wie schon aus früheren Veröffentlichungen über Furostanolsaponine bekannt ist<sup>4)</sup>, aus einer Mischung von 22-Hydroxy- (**2a**) und 22-Methoxyfurostanol-Glycosid (**2b**), wie durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie an Kieselgel gezeigt werden konnte. Die Aufarbeitung des in Methanol als Lösungsmittel eingestellten Gleichgewichtsgemisches von 22-Hydroxy- und 22-Methoxyfurostanol gelang nicht vollständig, so daß die Strukturermittlung mit dem Gemisch vorgenommen werden mußte. Daß Gitogenin nicht das eigentliche Genin des Hauptglycosides darstellt, zeigte das IR-Spektrum, in dem die für Spirostanolverbindungen typischen Banden bei 845, 892 und 912  $\text{cm}^{-1}$  fehlten.

Zum Nachweis der Furostanolstruktur (Aglycon mit zwei Zuckerketten an 3-OH und 26-OH) wurde a) eine katalytische Hydrierung und b) eine Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  durchgeführt.

a) Bei Raumtemperatur in Methanol als Lösungsmittel und mit Platin(IV)-oxid als Katalysator wird nur die 22-Hemiacetalgruppierung hydriert<sup>5)</sup>; die anschließende saure Hydrolyse ergab das polarere Aglyconderivat Dihydrogitogenin im Gegensatz zum unpolaren Gitogenin, das bei der direkten sauren Hydrolyse von **2a** bzw. **2b** entsteht.

b) Die  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion in wäßriger Lösung<sup>4)</sup> von **2a** bzw. **2b** mit anschließender Hydrolyse lieferte als Beweis der Hemiacetalgruppierung ein Reaktionsgemisch, das neben verschiedenen polareren Verbindungen Dihydrogitogenin enthielt.

Wurde Capsicosid der sauren Hydrolyse unterworfen, lieferte es als Aglycon Gitogenin, wie sich durch Dünnschichtchromatographie beim Vergleich mit authentischem Material ergab. Einen weiteren Hinweis bildete das Massenspektrum mit einem Molekularpeak von 432. Das Acetat schmolz bei 235–240°C; der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression.

Zur Bestimmung des Zuckeranteils wurde zunächst das saure Hydrolysat nach Entfernen des Aglycons papierchromatographisch untersucht; es konnten die Zucker D-Glucose und D-Galactose nachgewiesen werden. Die quantitative Zuckerbestimmung durch Gaschromatographie der persilylierten Methylglycoside<sup>6)</sup> ergab für Glucose und Galactose ein Verhältnis von 5:1.

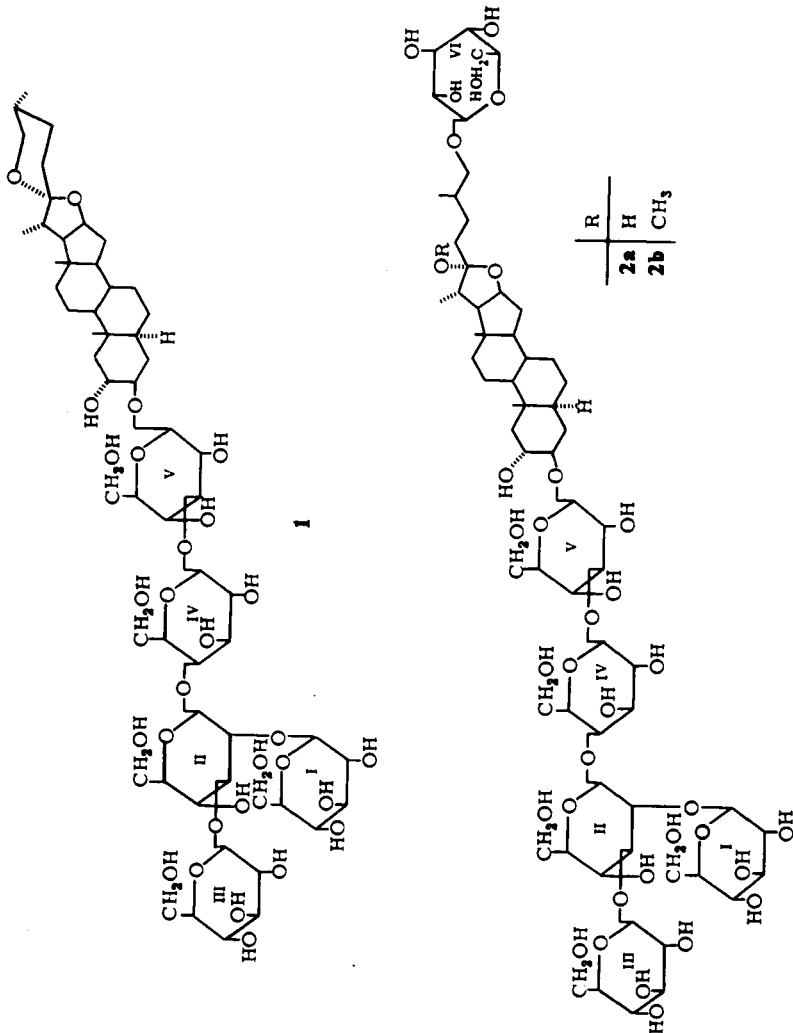
Die enzymatische Hydrolyse von Capsicosid mit  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus wentii* spaltete nur die  $\beta$ -D-Glucose-VI der Seitenkette ab, dabei bildete sich durch sofortigen Ringschluß das stabilere Spirostanol-Derivat, das Capsicosin (**1**) genannt

<sup>4)</sup> R. Tschesche, G. Lüdke und G. Wulff, Tetrahedron Lett. 1967, 2758; Chem. Ber. 102, 1253 (1969).

<sup>5)</sup> R. Tschesche, B. T. Tjoa, G. Wulff und R. V. Noronha, Tetrahedron Lett. 1968, 5141.

<sup>6)</sup> G. Wulff, J. Chromatogr. 18, 285 (1965).

wurde. Mit Hilfe der Säulenchromatographie konnte **1** zunächst nur amorph erhalten werden, doch kristallisierte es aus Methanol. Die saure Hydrolyse von **1** lieferte wieder Gitogenin und Glucose und Galactose als Zuckerkomponenten. Die quantitative Zuckerbestimmung durch Gaschromatographie der persilylierten Methylglycoside<sup>6)</sup> ergab Glucose und Galactose im Verhältnis 4:1.



Um die Struktur der Zuckerkette zu klären, wurde Capsicosin zunächst nach Kuhn<sup>7)</sup> permethyliert und anschließend sauer hydrolysiert. Nach säulenchromatographischer Trennung an Kieselgel wurden 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose, 2,3,6-

<sup>7)</sup> R. Kuhn, I. Löw und H. Trischmann, Chem. Ber. 90, 203 (1957).

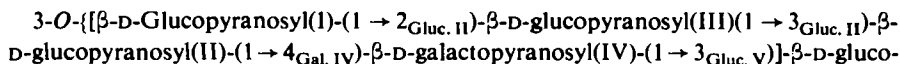
Tri-*O*-methyl-*D*-galactose, 2,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose und 4,6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose erhalten; letztere Verbindung weist auf eine Verzweigung der Zuckerkette hin. Dementsprechend wurden auch zwei endständige Tetramethylglucosen gefunden. Die in dem Molverhältnis 2:1:1:1 auftretenden Methylzucker fielen bis auf die 2,3,6-Tri-*O*-methyl-*D*-galactose kristallin an und wurden durch Vergleich mit authentischem Material identifiziert.

Zur Klärung der Anordnung der Zucker in der Kette sollte eine enzymatische Spaltung dienen. Mit  $\beta$ -Glucosidase wurde auch unter extremen Bedingungen keine Veränderung am Capsicosin festgestellt. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß eine Verzweigung gegen Ende der Kette vorliegen sollte. Um diese Annahme zu stützen und zugleich die Stellung der Galactose zu bestimmen, führte man eine partielle Säurehydrolyse<sup>8)</sup> in Dioxan/0.25 N HCl (2:1) durch. Dabei ließen sich dünnschichtchromatographisch 4 Spaltprodukte nachweisen (A, B, C, D in der Reihenfolge steigender Polarität). Sie wurden einzeln nach *Kuhn*<sup>7)</sup> methyliert und anschließend hydrolysiert. Nach dünnschichtchromatographischem Vergleich mit authentischen Substanzen entstanden jeweils neben Gitogenin bei A: 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose, B: 2,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose und 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-galactose, C: 2,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose, 2,3,6-Tri-*O*-methyl-*D*-galactose und 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose, D: 2,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose, 2,3,6-Tri-*O*-methyl-*D*-galactose und 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose. 4,6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose, bei der Hydrolyse des permethylierten Derivates von **1** entstanden, trat nicht mehr auf, dafür eine weitere 2,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose.

Da mit Hilfe der üblichen chemischen Methoden (Perjodat-Spaltung)<sup>9)</sup> die Natur der Kettenverzweigung nicht geklärt werden konnte, unterwarf man Spaltprodukt D der enzymatischen Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucosidase. Schon nach wenigen Stunden zeigte sich, daß D allmählich in C und nach einem Tag langsam zu B gespalten wurde. Dieser Befund bestätigte die Annahme über die Anordnung der Zucker in der Kette. Nach Aufheben der Kettenverzweigung durch die saure Partialhydrolyse spaltete  $\beta$ -Glucosidase die Glucosen bis zur Galactose ab.

Die vollständige Klärung der Art der Zuckerkette erfolgte durch Permethylierung von Capsicosid nach *Kuhn*<sup>7)</sup> und die anschließende saure Hydrolyse. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose, 2,3,6-Tri-*O*-methyl-*D*-galactose, 2,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose und 4,6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose, deren Natur durch Vergleich mit authentischem Material gesichert wurde. Das Molverhältnis der methylierten Zucker betrug 3:1:1:1. Der Vergleich mit den Molverhältnissen der Methylzucker von **1** zeigte, daß ein Molekül Tetramethyl-*D*-glucose zusätzlich gebildet worden war. Daraus folgt, daß im Capsicosid eine  $\beta$ -glycosidisch verknüpfte Glucose am OH an C-26 vorliegt.

Für das Capsicosid (**2a**) ergibt sich somit folgende Struktur:



<sup>8)</sup> R. Tschesche und G. Wulff, *Tetrahedron* **19**, 621 (1963).

<sup>9)</sup> I. Goldstein, G. W. Hay, B. A. Lewis und F. Smith, *Methods Carbohydr. Chem.* **5**, 361 (1965).

pyranosyl(V))-26-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(VI)]-(25R)-5 $\alpha$ -furostan-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-tetrol. Daß die Verzweigung in der Zuckerkette an der Glucose II erfolgt, erscheint zwar wahrscheinlich, doch kann die Möglichkeit einer Bindung der Glucose I an V nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Die Annahme der  $\beta$ -glycosidischen Verknüpfung<sup>10)</sup> ergibt sich aus den verschiedenen mit  $\beta$ -Glucosidase erhaltenen Spaltprodukten bzw. beruht auf Analogieschlüssen.

Das Aglycon des Capsicosids weist an C-2  $\alpha$ - und C-3  $\beta$ -Hydroxylgruppen auf. Um zu klären, über welche der OH-Gruppen die Zuckerkette gebunden ist, oxidierte man den bei der Permethylierung und anschließenden Hydrolyse von **2a** bzw. **2b** angefallenen Nichtzuckeranteil mit CrO<sub>3</sub>. Hierbei wird die frei vorliegende Hydroxylgruppe des gebildeten Gitogeninderivates in eine Ketogruppe verwandelt. Ein Vergleich der kristallin anfallenden Verbindung mit 5 $\alpha$ -Spirostan-2 $\alpha$ -ol-3-on-2-methyläther mit den für diese Verbindung in der Literatur<sup>11)</sup> angegebenen Schmelz- und Drehwerten bestätigte die Annahme, daß die Zuckerkette über die Hydroxylgruppe an C-3 verknüpft ist.

Die Untersuchung der hämolytischen Wirkung entsprach in ihrem Ergebnis den bisherigen Feststellungen<sup>12)</sup>; so zeigte Capsicosid keine Aktivität, während das Spirostanolderivat Capsicosin mit 2  $\mu$ g/ml starke hämolytische Wirkung aufwies. Entsprechende Ergebnisse lieferten antibiotische Tests, die für **1** die erwartete Aktivität zeigten; dieser Befund stimmt mit den Aussagen von Frau Gal überein, obwohl sie nicht die genaue Struktur kannte.

Bemerkenswert ist, daß im Gegensatz zu den in den Samen von *Digitalis purpurea* bzw. *Dig. lanata* vorkommenden Spirostanolglycosiden sich in denen von *Capsicum annuum* L. vorwiegend Furostanolglycoside finden.

Dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. G. Wulff für viele wertvolle Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. E. Schlösser sei für die Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit, Herrn Prof. Dr. F. Schönbeck für die mikrobiologischen Untersuchungen 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 Mikroskopheitzisch nach Kofler-Weygand, die optische Drehung mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Die IR-Spektren wurden mit dem Spektrophotometer Perkin-Elmer, Modell 221, mit Gitter-Prismen-Austauscheinheit, die Massenspektren mit dem Gerät CH4 der Atlas-MAT-GmbH aufgenommen. Die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Merck)<sup>13)</sup> erfolgte nach den üblichen Methoden. Als Ansprühereagenz wurde 30proz. Schwefelsäure oder Anilinphthalat in Isobutylalkohol<sup>14)</sup>

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

<sup>11)</sup> T. Kawasaki, I. Nishioka, T. Komori, T. Yamauchi und K. Miyahara, Tetrahedron **21**, 299 (1965).

<sup>12)</sup> G. Wulff, Deut. Apoth.-Ztg. **108**, 797 (1968).

<sup>13)</sup> R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

<sup>14)</sup> S. M. Partridge, Nature (London) **164**, 443 (1949).

verwendet. Zur Papierchromatographie diente das Papier Whatman Nr. 1; es wurde absteigend entwickelt. Zur Säulenchromatographie benutzte man das Kieselgel der Firma Gebrüder Herrmann, Köln.

Für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie wurden folgende Fließmittelsysteme angewandt:

A: Chloroform/Methanol/Wasser (65:35:10)<sup>15</sup>, B: Chloroform/Methanol/Wasser (65:30:10), C: Chloroform/Methanol/Wasser (65:10:5), D: Chloroform/Methanol/Wasser (90:9:0.2)<sup>16</sup>, E: Benzol/Aceton (10:1), F: Benzol/Aceton (10:3), G: Benzol/Aceton (7:1), H: Benzol/Aceton (1:1), I: Benzol/Aceton (90:3), J: Diisopropyläther/Methanol (5:1).

Fließmittelsysteme für Papierchromatographie: K: Essigester/Pyridin/Wasser (3.6:1:1.15)<sup>17</sup>, L: n-Butanol/Wasser/Tetrachlorkohlenstoff (4:4:3)<sup>18</sup>, M: Benzol/Äthanol/Wasser/Ammoniak (200:47:14:1)<sup>19</sup>, N: Butanol/Äthanol/Wasser/Ammoniak (40:10:49:1)<sup>11</sup>.

Zur Gaschromatographie benutzte man das Gerät F7/HF von Perkin-Elmer mit Integrator und Kienzle-Digitaldrucker. Als Detektor diente eine Wärmeleitfähigkeitszelle, Trägergas war Helium bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 30 ml/min; Einspritzblock und Detektor wurden auf 25°C, der Säulenofen auf 170°C geheizt.

Die enzymatischen Spaltungen führte man mit  $\beta$ -Glucosidase<sup>10</sup> aus *Aspergillus wentii* durch.

**Isolierung der Saponine:** 1 kg Gewürzpaprikasamen wurde mit Sand vermischt, mechanisch zerkleinert und zehnmal mit 8 Liter 80proz. Methanol extrahiert. Den erhaltenen rotbraunen Extrakt schüttelte man mehrmals mit Petroläther aus, um unpolare Stoffe abzutrennen. Etwa 152 g des gesamten Extraktes zog man auf 200 g Kieselgel auf und chromatographierte an 1.5 kg Kieselgel mit System A. Etwa 11.5 g des erhaltenen Saponingemisches wurden anschließend im System B an Kieselgel (Verhältnis 1:100) säulenchromatographisch getrennt und einer Nachreinigung an Sephadex G-25 mit Wasser als Elutionsmittel unterworfen; es wurden 3.17 g Capsicosid (**2a** bzw. **2b**) als ein gelblich-weißes Pulver mit dem Zers.-P. 295°C erhalten,  $[\alpha]_D^{25} = -35^\circ$  ( $c = 0.3$ , Chloroform/Methanol 1:1).

Im System A betragen die  $R_F$ -Werte für **2a** bzw. **2b** 0.20 bzw. 0.22. IR (KBr): Es fehlen die für eine Spirocetal-Gruppierung charakteristischen Absorptionen<sup>20,21</sup> bei 845, 892 und 912  $\text{cm}^{-1}$ , in diesem Bereich findet man lediglich eine verbreiterte Bande bei 900  $\text{cm}^{-1}$ .

**Hydrierung:** 100 mg **2a** bzw. **2b** wurden in Methanol mit 30 mg Platin(IV)-oxid als Katalysator 4 d bei Raumtemp. unter Rühren und einem  $\text{H}_2$ -Überdruck von etwa 40 Torr hydriert. Danach filtrierte man vom Katalysator ab und engte das Filtrat zur Trockne ein. Man erhielt nach 5stdg. Hydrolyse mit einigen ml 0.6 N methanolischer HCl bei 80°C und anschließender Chromatographie an Kieselgel im System F 3 mg Dihydrogitogenin, das mit authent. Material identisch war (Mischprobe, MS).

**$\text{NaBH}_4$ -Reduktion:** 100 mg **2a** bzw. **2b** wurden mit 12.5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und mit 10 mg  $\text{NaBH}_4$  bei Raumtemp. 12 h stehengelassen. Danach stellte man das Reaktionsgemisch mit konz. Salzsäure auf 3 N HCl ein und erhitze es nach Zugabe von 5 ml Benzol unter Rückfluß

<sup>15</sup> T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. Pharm. Bull. **11**, 1546 (1963).

<sup>16</sup> R. Tschesche und H. Schulze, Chem. Ber. **107**, 2710 (1974).

<sup>17</sup> P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirotta, G. Ruffini und A. Sartori, J. Chromatogr. **3**, 343 (1960).

<sup>18</sup> R. Tschesche und G. Wulff, Tetrahedron **19**, 621 (1963).

<sup>19</sup> H. C. Srivastawa und G. Adams, Can. J. Chem. **40**, 1415 (1962).

<sup>20</sup> R. Tschesche, G. Wulff und G. Baile, Tetrahedron **18**, 959 (1962).

<sup>21</sup> M. E. Wall, C. R. Eddy, M. L. McClellan und M. E. Klumpp, Anal. Chem. **24**, 1337 (1952).

4 h lang. Die Benzolschicht wurde sodann abgetrennt, die H<sub>2</sub>O-Phase dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach der Trennung des Gemisches erhielt man neben einer Reihe von polaren Substanzen Gitogenin und Dihydrogitogenin, wie mit authent. Material nachgewiesen werden konnte.

*Saure Hydrolyse:* 150 mg **2a** bzw. **2b** wurden mit 6 ml 5proz. methanolischer HCl versetzt und 5 h unter Rückfluß erhitzt. Das Hydrolysat wurde mit 7 ml H<sub>2</sub>O verdünnt, das Methanol abgedampft und das Aglycon mit n-Butanol extrahiert. Nach der Trennung an 10 g Kieselgel im System E erhielt man 32 mg Gitogenin (MS: *m/e* = 432; Schmp. 261–266°C;  $[\alpha]_D^{25} = -63^\circ$  (*c* = 0.5, Chloroform).

*Acetylgitogenin:* 25 mg Gitogenin in 2 ml Pyridin p. a. wurden mit 1 ml Acetanhydrid versetzt und 15 h stehengelassen. Zur Hydrolyse des überschüssigen Acetanhydrids goß man das Reaktionsgemisch auf Eis und extrahierte anschließend mit Chloroform. Die Reinigung des zur Trockene gebrachten Chloroformextraktes erfolgte über eine Kieselgelsäule mit dem System I und anschließender Umkristallisation aus Methanol (Schmp. 235–240°C). Der Misch-Schmp. zeigte mit authent. Material keine Depression.

*Identifizierung der Zucker:* Zur Bestimmung des Zuckeranteils wurde das saure Hydrolysat von **2a** bzw. **2b** nach Entfernen des Aglycons papierchromatographisch (System K) untersucht. Es konnte durch Vergleich D-Glucose und D-Galactose nachgewiesen werden.

*Enzymatische Spaltung mit  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus wentii*:* 2.0 g **2a** bzw. **2b** wurden in 40 ml H<sub>2</sub>O gelöst, mit 5 ml Enzymlösung und einigen Tropfen Toluol versetzt und die Mischung bei 39°C im Brutschrank aufbewahrt. Die Spaltung, die man dünnschichtchromatographisch im System A verfolgte, war nach 2 d vollständig. Nach Zugabe von 50 ml Methanol und Kochen unter Rückfluß flockte das Enzym aus; man engte die wäßrige Phase ein und reinigte sie säulenchromatographisch im System B. Dabei erhielt man 1.2 g **1**. Schmp. 285 bis 290°C (Zers., aus Methanol);  $[\alpha]_D^{25} = -47^\circ$  (*c* = 0.15, Methanol/Wasser 1:1).

*Permethylierung von 1:* Die Lösung von 550 mg **1** in 6.5 ml Dimethylformamid wurde mit 4.5 ml Methyljodid und 5 g Ag<sub>2</sub>O versetzt. Nach 24 h filtrierte man und wusch mit DMF und H<sub>2</sub>O nach. Dem Filtrat gab man in H<sub>2</sub>O gelöstes KCN hinzu, bis die Lösung klar wurde; dann extrahierte man mehrfach mit Chloroform und destillierte das überschüssige DMF ab. Das so erhaltene Methylglycosid, das im IR-Spektrum keine OH-Banden mehr zeigte, wurde an Kieselgel im System E als mobiler Phase gereinigt (Ausb. 205 mg).

*Hydrolyse des permethylierten Capsicosins:* Das permethylierte Produkt (**1**) wurde 6 h in 10 ml 5proz. methanolischer HCl unter Rückfluß gekocht. Nach Zusatz der gleichen Menge Wasser und Abdestillieren des Methanols saugte man das ausgefallene Aglycon ab und engte die wäßrige Lösung ein. Zur Spaltung der Methylglycoside kochte man 5 h mit 8 ml 2 N HCl. Die Neutralisation erfolgte mit Dowex 3; nach Befreien vom Lösungsmittel trennte man das Methylzuckergemisch durch Chromatographie an 100 g Kieselgel mit Benzol/Aceton-Gemisch steigender Polarität (8:1, 6:1, 4:1, 3:1, 1:1). So erhielt man 52 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose, 24 mg 2,3,6-Tri-*O*-methyl-D-galactose, 20 mg 2,4,6-Tri-*O*-methyl-D-glucose und 22 mg 4,6-Di-*O*-methyl-D-glucose. Die Identifizierung der Zucker geschah nach üblichen Methoden.

*2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose:* Schmp. 92–94°C (aus Petroläther);  $[\alpha]_D^{25} = +95^\circ \rightarrow +86.5^\circ$  (*c* = 0.5, Wasser). Chromatographisches Verhalten (Systeme C, D, J) und Mischprobe mit authent. Material bewiesen die Identität.

*2,3,6-Tri-*O*-methyl-D-galactose:*  $[\alpha]_D^{25} = +80^\circ$  (*c* = 0.7, Wasser). Die nach der Chromatographie erhaltene Substanz ist als nicht kristallin beschrieben. Nach IR-Spektrum, Dünn-

schicht- (Systeme C, D, J) sowie Papierchromatographie in den Systemen L, M, N konnte die Natur der Verbindung beim Vergleich mit authent. Material eindeutig bewiesen werden.

**2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose:** Schmp. 122–125°C (aus Petroläther);  $[\alpha]_D^{25} = +105^\circ \rightarrow +78^\circ$  ( $c = 0.3$ , Wasser). Die Verbindung erwies sich nach Mischprobe und chromatographischem Verhalten (Systeme C, D, J) als identisch mit authent. Material.

**4,6-Di-O-methyl-D-glucose:** Schmp. 156–158°C (aus Essigester);  $[\alpha]_D^{25} = \therefore 101^\circ \rightarrow +67^\circ$  ( $c = 0.5$ , Wasser). Chromatographisches Verhalten in den Systemen C, D, J und Mischprobe erwies die Identität mit authent. Material.

**Quantitative Zuckerbestimmung<sup>6)</sup> von 1 und 2a bzw. 2b:** Zur quantitativen Zuckerbestimmung wurden 40 mg von 1 in der üblichen Weise mit 5proz. methanol. Salzsäure hydrolysiert und die Lösung mit Dowex 3 neutralisiert. Die erhaltenen Methylglycoside überführte man in üblicher Weise in die Silylverbindungen. Die gaschromatographische Bestimmung lieferte für D-Glucose und D-Galactose ein Verhältnis von 4:1. Die quantitative Zuckerbestimmung von 2a bzw. 2b ergab für D-Glucose und D-Galactose ein Verhältnis von 5:1.

**Methylierung und Hydrolyse von 2a bzw. 2b:** 600 mg 2a bzw. 2b löste man in 7 ml Dimethylformamid und fügte 5 ml Methyljodid sowie 5.5 g Ag<sub>2</sub>O zu. 24 h später wurde in üblicher Weise aufgearbeitet. Man erhielt nach säulenchromatographischer Trennung und saurer Hydrolyse 69 mg 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose, 23 mg 2,3,6-Tri-O-methyl-D-galactose, 20 mg 2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose und 21 mg 4,6-Di-O-methyl-D-glucose, wie ein Vergleich mit authent. Material ergab.

**Partielle Säurehydrolyse von 1:** 200 mg Capsicosin wurden in 30 ml Dioxan/0.25 N HCl (2:1) 1.5 h unter Rückfluß auf 80°C erhitzt. Nach Abdestillieren des Dioxans extrahierte man mehrmals mit Butanol, wusch mit Wasser und brachte die organische Phase zur Trockene. Das so erhaltene Glycosidgemisch wurde an Kieselgel mit dem System C chromatographiert. Die anfallenden vier Produkte Monoglycosid A, Diglycosid B, Triglycosid C und Tetraglycosid D wurden nach üblicher Methode methyliert und hydrolysiert. Nach Abtrennen des Aglycons wurden in den Systemen C, D, J dünnschichtchromatographisch sowie papierchromatographisch (Systeme M, N) folgende Methylzucker gefunden:

In A: 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose; in B: 2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose und 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-galactose; in C und D: 2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose, 2,3,6-Tri-O-methyl-D-galactose und 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose, die man mittels authent. Material identifizierte.

**Oxidation des Methylgitogenins:** 10 mg des nach Hydrolyse aus methyliertem Glycosid erhaltenen Methylgitogenins wurden in 0.5 ml Eisessig gelöst und mit 5 mg CrO<sub>3</sub> versetzt. Nach 1.5 h fügte man NaHSO<sub>3</sub>, in Wasser gelöst, zur Reduktion des überschüssigen CrO<sub>3</sub> hinzu und extrahierte anschließend mit Äther. Mit in Wasser gelöstem NaHCO<sub>3</sub> wusch man mehrfach nach und reinigte schließlich die zur Trockene gebrachte organische Phase an Kieselgel im System E. Ausb. 4 mg 5 $\alpha$ -Spirostan-2 $\alpha$ -ol-3-on-2-methyläther; Schmp. 182 bis 189°C;  $[\alpha]_D^{25} = -17.5^\circ$  ( $c = 0.49$ , Aceton); Lit.<sup>11)</sup>: Schmp. 177–188°C;  $[\alpha]_D^{25} = -18^\circ$  ( $c = 0.42$ ).