

CHEMISCHE BERICHTE

In Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

herausgegeben von der

GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

110. Jahrg. Nr. 7

S. 2407–2664

Über Triterpene, XXXII¹⁾

Über die Zuckerkette des Hauptsaponins aus den Wurzeln von *Primula elatior* L. Schreber

Rudolf Tschesche* und Wolfgang Wiemann

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,
Max-Planck-Str. 1, D-5300 Bonn

Eingegangen am 30. September 1976

Aus den Wurzeln und Rhizomen von *Primula elatior* L. Schreber (als Expektorans verwendet) wurden neben dem Hauptsaponin vier Nebensaponine isoliert. Für das Hauptsaponin, dessen genuines Aglycon schon früher als Protoprimulagenin A (1)^{1,2)} identifiziert worden war, wurde die Verknüpfung in der Zuckerkette, bestehend aus D-Glucuronsäure, D-Galactose, D-Glucose und L-Rhamnose, bestimmt.

Triterpenes, XXXII¹⁾

The Sugar Chain of the Main Saponin from the Roots of *Primula elatior* L. Schreber

From the roots and rhizomes of *Primula elatior* L. Schreber (used as an expectorant) there were isolated the main saponin and four further minor saponins. In the case of the main saponin, whose genuine aglycone has already earlier been identified as protoprimumagenin A (1)^{1,2)}, the structure of the sugar chain consisting of D-glucuronic acid, D-galactose, D-glucose, and L-rhamnose has been established.

Isolierung der Saponine

Als Ausgangsmaterial wurden gefrorene Wurzeln der Fa. H. Borntäger (Offstein) in Methanol/Wasser (4:1) zerkleinert. Zur Entfernung von Begleitstoffen, wie Oligosacchariden und anorganischen Salzen, wurde das Methanol abgezogen und der wäßrige Rückstand

¹⁾ XXXI. Mitteil.: R. Tschesche und L. Ballhorn, *Phytochemistry* **14**, 305 (1975).

²⁾ I. Kitagawa, A. Matsuda und I. Yosioko, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 5377.

mehrmals mit n-Butanol extrahiert. Der eingengte Extrakt wurde über eine Filtersäule grob gereinigt. Dabei fiel ein noch schwach gelb gefärbtes, amorphes Material an. Die säulenchromatographische Feintrennung lieferte ein nahezu farbloses Produkt, das nach Dünnschichtchromatographie aus einem Gemisch von Substanzen bestand, nach deren R_F -Wert aber eine weitere Auftrennung durch Säulenchromatographie wenig erfolgversprechend erschien.

Gemäß früheren Arbeiten^{3,4)} wurde das Gemisch mit etherischer Diazomethanlösung versetzt und das erhaltene Methylestergemisch säulenchromatographisch aufgetrennt. Insgesamt konnten fünf Substanzen unterschieden werden, denen die Bezeichnungen PS1–PS5 gegeben wurden. Während die Methylester PS1/2 und PS2/3 zunächst nur im Gemisch erhalten wurden, fielen die Saponine PS3, PS4 und PS5 neben wenig Gemisch von PS3/4 und PS4/5 rein an.

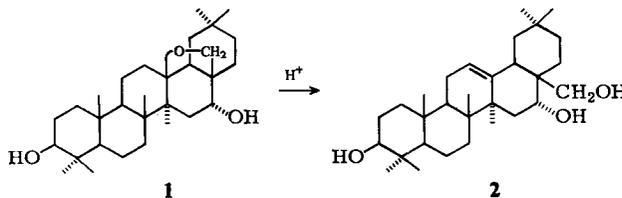
Nach den Mengenverhältnissen der isolierten Substanzen wurde eine Zuordnung in Haupt- und Nebensaponine in der Weise getroffen, daß Substanz PS4 als Hauptsaponin gilt (vgl. Tab. 1).

Tab. 1. Zusammensetzung des Saponingemischs

Hauptsaponin	Nebensaponin	Prozentgehalt
PS4		47–52%
	PS3	30–35%
	PS5	8–14%
	PS(1 + 2)	5–8%

Verknüpfung der Zucker

Die weiteren Untersuchungen erfolgten am Zuckerteil des Hauptsaponins PS4. Zur Bestimmung der Monosaccharide der Zuckerkette wurde das genuine Hauptsaponin sauer hydrolysiert. Nach Abtrennen des Aglycons, Protoprimulagenin A (1), das sich unter dem Einfluß der Säure hauptsächlich in Primulagenin A (2) umwandelte^{1,2)}, bestätigte die Untersuchung durch Papierchromatographie in den verschiedensten Systemen^{5–7)} mit authentischen Zuckern als Vergleich die schon früher gemachten Beobachtungen^{4,8)}:



³⁾ R. Tschesche und F. Ziegler, Liebigs Ann. Chem. **674**, 160 (1964).

⁴⁾ R. Tschesche, B. T. Tjoa und G. Wulff, Liebigs Ann. Chem. **696**, 160 (1966).

⁵⁾ F. G. Fischer und H. Dörfel, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **301**, 224ff. (1955).

⁶⁾ L. Hough und J. K. N. Jones, Übersichtsartikel in „Methods of Carbohydrate Chemistry“, Bd. I, S. 21ff, Ed.: R. L. Whistler und M. L. Wolfrom, Academic Press, New York und London 1962.

⁷⁾ P. Colombo, D. Carbetta, A. Pirota, G. Ruffini und A. Sarori, J. Chromatogr. **3**, 343 (1960).

⁸⁾ L. Ballhorn, Diplomarbeit (unveröffentlicht).

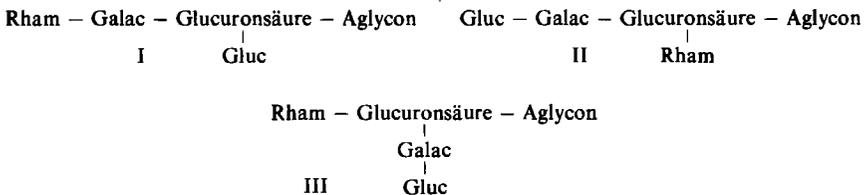
neben Rhamnose, Glucose und Galactose war noch Glucuronsäure als vierter Zuckerbaustein vorhanden.

Zur quantitativen Bestimmung der Monosaccharide wurde nach Natriumborhydrid-Reduktion des Methylesters mit methanolischer Salzsäure hydrolysiert. Das erhaltene Methylglycosidgemisch wurde persilyliert und mittels Gaschromatographie⁹⁾ quantitativ bestimmt. Mit Hilfe eines Vergleichsgemisches wurde für das Hauptsaponin ein Zucker-Verhältnis von Rhamnose:Glucose:Galactose = 1:2:1 gefunden. Dieses Ergebnis bestätigt zugleich noch einmal, daß es sich bei der Uronsäure um Glucuronsäure handelt.

Zur Bestimmung der Verknüpfung der Zuckerbausteine wurde das reduzierte Hauptsaponin nach *Kuhn*¹⁰⁾ permethyliert; eine Nachmethylierung erfolgte wegen der Unvollständigkeit nach *Hakomori*¹¹⁾.

Das nach der Permethylierung entstandene Hauptprodukt wurde sauer hydrolysiert. Die säulenchromatographische Reinigung des erhaltenen Methylzuckergemisches lieferte die vier Methylzucker 2,3,4-Tri-*O*-methylrhamnose, 2,3,4,6-Tetra-*O*-methylglucose, 2,3,4-Tri-*O*-methylgalactose und 3,6-Di-*O*-methylglucose, von denen die Glucosederivate kristallisiert erhalten werden konnten.

Da schon früher^{12, 13)} festgestellt worden war, daß die Uronsäure geninständig sein mußte, konnte aufgrund der gefundenen Methylzucker eine erste Zuordnung getroffen werden. Danach mußten Rhamnose und eine Glucose endständige Positionen in der Zuckerkette einnehmen. Die stark untermethylierte Glucose, die durch Reduktion nach Methylierung aus der Glucuronsäure entstanden war, mußte eine Verzweigungsstelle aufweisen. So bestanden folgende Möglichkeiten für eine Zucker-Verknüpfung:



Eine eindeutige Unterscheidung zwischen diesen Möglichkeiten konnte durch Partialhydrolyse des reduzierten Hauptsaponins getroffen werden. Dabei erhielt man neben einem Oligosaccharid eine im Vergleich zum Ausgangsprodukt unpolare Substanz, die mit Schwefelsäure eine den Saponinen analoge violette, mit Anilinphtalal jedoch keine Färbung zeigte.

Die saure Hydrolyse des Oligosaccharids ergab, daß es sich hierbei um ein Disaccharid handelte, bestehend aus Glucose und Galactose. Somit waren diese beiden Zucker direkt miteinander verbunden. Die Säurespaltung des permethylierten Disaccharids lieferte die beiden Methylzucker 2,3,4,6-Tetra-*O*-methylglucose und 2,3,4-Tri-*O*-methylgalactose; dadurch wurde obige Feststellung erhärtet.

⁹⁾ G. Wulff, *J. Chromatogr.* **18**, 285 (1965).

¹⁰⁾ R. Kuhn, H. Trischmann und J. Löw, *Angew. Chem.* **67**, 32 (1955).

¹¹⁾ S. Hakomori, *J. Biochem. (Tokyo)* **55**, 205 (1964) [*C. A.* **60**, 15959 (1964)].

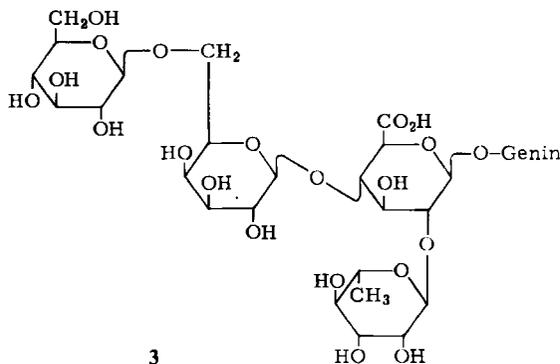
¹²⁾ I. Kitagawa, M. Yoshikawa, Y. Imakura und I. Yosioka, *Chem. Ind. (London)* **1973**, 276.

¹³⁾ I. Kitagawa, M. Yoshikawa und I. Yosioka, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 3997.

Analog wurde mit dem unpolaren Saponinteil verfahren. Die saure Hydrolyse ergab als Monosaccharide Glucose und Rhamnose. Dies zeigte, daß die Rhamnose unmittelbar mit der Glucose – ehemalige Glucuronsäure – verbunden war. Aufschluß über die genaue Position der Verknüpfung von Rhamnose und Glucuronsäure einerseits und dem Disaccharid Glucose/Galactose und Glucuronsäure andererseits gab die saure Spaltung des permethylierten Disaccharidsaponins. Es wurden dabei die Methylzucker 2,3,4-Tri-*O*-methylrhamnose und 3,4,6-Tri-*O*-methylglucose erhalten.

Die Verknüpfungsart der Zucker (α oder β) wurde mittels geeigneter Fermente bestimmt³⁾.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte von den genannten drei Möglichkeiten der Verknüpfung nur noch die zweite als gegeben angenommen werden. Danach folgte für das Hauptsaponin der Wurzeln von *Primula elatior* L. Schreber die Konstitution **3** eines 3- \langle [β -D-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)]-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucuronpyranosyl \rangle protoprimulagenins A (oder 3- \langle)-16-hydroxy-13 β ,28-epoxy-oleanans).



Das Hauptsaponin (**3**) hat also eine verzweigte Zuckerkette.

Analoge Untersuchungen erfolgten am Zuckerteil der Nebensaponine. Es ergaben sich qualitativ die gleichen Zucker, nämlich Rhamnose, Glucose, Galactose und Glucuronsäure, deren quantitatives Verhältnis mittels Gaschromatographie der persilylierten Methylglycoside wiederum zu Rhamnose:Glucose:Galactose = 1:2:1 bestimmt wurde.

Auch die Permethylierung mit anschließender Säurespaltung lieferte im wesentlichen die schon oben angegebenen Methylzucker.

Dieses Ergebnis veranlaßte zu der Schlußfolgerung, daß in Haupt- und Nebensaponinen neben den gleichen Monosaccharideinheiten auch die gleiche Verknüpfung dieser Zuckerbausteine anzutreffen ist, demnach eine Unterscheidung nur durch offenbar geringfügige strukturelle Unterschiede der einzelnen zugehörigen genuinen Aglycone gegeben ist.

Diese Vorstellungen müssen weitere Untersuchungen des Aglycons allerdings noch bestätigen.

Dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Mikroskopheiztisch nach Kofler-Weygand. Messung der optischen Drehung mit dem Polarimeter Modell 141 von Perkin-Elmer. Säulenchromatographie: Kieselgel der Fa. Woelm (Korngröße 0.063–0.1 mm). Dünnschichtchromatographie (DC): Fertigfolien F 1500 säurestabil von Schleicher & Schüll. Papierchromatographie: Chromatographierpapier Whatman Nr. 1; die Chromatogramme wurden absteigend und aufsteigend¹⁴⁾ entwickelt. Zum Sichtbarmachen wurde mit 30proz. Schwefelsäure für die Glycoside und mit Anilinphthalat für die einfachen und methylierten Zucker besprüht und anschließend auf einer Heizplatte erwärmt.

Gaschromatographie: Gerät F 7 von Perkin-Elmer mit Integrator D 2 und Kienzle Digitaldrucker.

Folgende Laufmittelsysteme kamen zur Anwendung:

A	Chloroform/Methanol/Wasser	65:45:12	
B	dto.	65:35:10 ¹⁴⁾	(org. Phase)
C	dto.	65:15:2	(mit steigendem Methanol-Gehalt)
D	dto.	125:25:3	
E	dto.	90:9:0.2	(für Methylzucker)
F	Cyclohexan/Chloroform/Aceton	7:3:1	(permethyliertes Saponin)
G	Petrolether (60–90°C)/Aceton	2:1	
H	Essigester/Pyridin/Wasser	3.6:1:1.5 ⁷⁾	
I	dto.	2:1:1	
K	Essigester/Eisessig/Aceton	3:3:1	(für Uronsäuren)
L	Isooctan/Isopropylalkohol/ NH ₃ · aq (10%)	65:25:2 ¹⁵⁾	
M	n-Butanol/Ethanol/Wasser	2.1:1:1	(für Monosaccharide und Uronsäuren)
N	Pyridin/Ethanol/Eisessig/Wasser	10:1:2.3:4	
O	Cyclohexan/Aceton	10:1; 2; 3; 4	
P	dto.	2:1	
		1:1	

Isolierung der Haupt- und Nebensaponine aus den Wurzeln von Primula elatior L. Schreber: 1.2 kg getrocknete Wurzeln von *Primula elatior* L. Schreber wurden nach Behandlung mit flüssigem Stickstoff im Mörser in einer ca. 80proz. Methanollösung mit dem Ultraturax zerkleinert. Die Lösung wurde von den festen Rückständen abfiltriert und der Rückstand jeweils noch 2 mal in gleicher Weise extrahiert. Die vereinigten wäßr. Methanolextrakte wurden auf ca. 1 Liter eingeeengt und mit n-Butanol ausgeschüttelt. Nach Abziehen des Butanols i. Vak. bei 45°C Badtemp. erhielt man 65 g festen Rohextrakt. Eine Grobtrennung erreichte man über eine 2-kg-Kieselgelsäule mit System B als Elutionsmittel. Man erhielt neben einem Vorlauf, der zahlreiche unpolare Substanzen enthielt, 32 g nicht ganz reines Saponin. Die Feintrennung einer 2-kg-Kieselgelsäule im System C ergab 16 g dünnenschichtchromatographisch reines Saponin (System B) und 10 g Saponin im Gemisch mit geringfügig polaren Substanzen.

Veresterung des Saponins: Die Lösung von 5 g Saponin in 1.5 Liter Methanol wurde auf 0°C abgekühlt. Unter Umschwenken versetzte man portionsweise mit 0.1 M etherischer Diazomethanlösung. Man ließ 6–8 h stehen, engte die Lösung bis auf ca. 1.5 Liter wieder ein und wiederholte den Prozeß. Die Umsetzung wurde chromatographisch im System B verfolgt. Sie erwies sich zu nahezu 100%; nach Aufarbeiten erhielt man 5.5 g verestertes Produkt. Die Auftrennung des veresterten Gemisches erfolgte über eine 800-g-Kieselgelsäule. Im System D wurden folgende Fraktionen eluiert:

¹⁴⁾ T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. Pharm. Bull. 11, 1546 (1963).

¹⁵⁾ F. Petek, Bull. Soc. Chim. Fr. 1, 263 ff. (1965).

	PS	R _F -Werte (System B)
PS (1 + 2) = 743.7 mg	0	0.37
PS (2 + 3) = 184.4 mg	1	0.87
PS (3) = 1.027 g	2	0.79
PS (3 + 4) = 182.4 mg	3	0.68
PS (4) = 1.36 g	4	0.62
PS (4 + 5) = 125.2 mg	5	0.58
PS (5) = 182.5 mg		
Rest = 1.6 g (Ausgangsprodukt)		

Reduktion des Methylesters des Hauptsaponins (PS 4): 250 mg Methylester in 100 ml Methanol wurden portionsweise mit 200 mg Natriumborhydrid (Überschuß) versetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemp. wurde zur Zerstörung des überschüssigen Boranats mit 10 ml Aceton versetzt. Man engte die Lösung zur Trockene ein, nahm in 100 ml Wasser auf und extrahierte 4 mal mit je 50 ml n-Butanol. Die vereinigten Butanolextrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt. Nach Trennung an Kieselgel über eine 30-g-Säule im System D erhielt man 230 mg reduziertes Hauptsaponin.

Qualitative Zuckerbestimmung des Hauptsaponins PS 4: 75 mg verestertes Hauptsaponin wurden 4 h in 20 ml 5proz. methanol. Salzsäure unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde mit Wasser auf das doppelte Vol. verdünnt, vom ausgefallenen Niederschlag des Genins abfiltriert und i. Vak. das Lösungsmittel abgezogen. Man erhielt 35 mg Aglycongemisch und 27 mg O-Methylglycoside. Nach Zugabe von 10 ml 2 N HCl zum Glycosidgemisch wurde 2 h bei 100°C nachhydrolysiert. Die Lösung wurde mit Silbercarbonat neutralisiert und das ausgefallene Silberchlorid abgetrennt. Zur chromatographischen Untersuchung wurden für die Dünnschichtchromatographie System A^{5,7,16)} und für die Papierchromatographie die Systeme H, I, K, M und N^{12,15,17)} nach der absteigenden Methode verwendet. Es wurden *Glucose*, *Galactose*, *Rhamnose* und *Glucuronsäure* gefunden.

Quantitative Zuckerbestimmung des Hauptsaponins PS 4: 20 mg reduziertes Hauptsaponin wurden in 10 ml 5proz. methanol. Salzsäure 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 10 ml Wasser verdünnt und von den ausgefallenen Produkten abfiltriert. Die wäbr. Phase wurde mit Ionenaustauscher Dowex-3 (OH-Form) neutralisiert und bei 60°C i. Vak. zur Trockene eingedampft. Nach viermaligem Abdampfen mit je 3 ml trockenem Benzol wurde das Glycosidgemisch in 0.8 ml trockenem Pyridin gelöst. Nach Hinzufügen von je 0.4 ml Trimethylsilan und Hexamethyldisilazan wurde das Gemisch unter Feuchtigkeitsausschluß 1 h auf 95°C erhitzt⁹⁾. Nach dem Abkühlen saugte man das ausgefallene Ammoniumchlorid ab und engte das Filtrat bei 60°C i. Vak. zur Trockene ein. Der Rückstand wurde mit 2 ml trockenem Benzol aufgenommen, das restliche Ammoniumchlorid erneut abgetrennt und das Filtrat wiederum zur Trockene eingedampft. Nach zweimaligem Abdampfen mit trockenem Benzol wurden zur Gaschromatographie 0.5 ml trockenes Benzol hinzugefügt. Das Verhältnis der Monosaccharide ergab sich zu Rhamnose:Glucose:Galactose = 0.78:1.98:1 (ber. 1:2:1).

Je 10 mg D-Glucose, D-Galactose und L-Rhamnose wurden in einigen ml Wasser gelöst und 24 h stehengelassen und auf diese Weise äquilibriert. Anschließend wurde zur Trockene eingedampft. Die so behandelten Vergleichszucker erhitzte man in je 5 ml wasserfreier 5proz. methanol. Salzsäure 4 h unter Rückfluß, arbeitete wie oben auf und silylierte sie in gleicher Weise.

¹⁶⁾ H. Günther und A. Schweiger, J. Chromatogr. 34, 498 (1968).

¹⁷⁾ R. Kuhn, Chem. Ber. 90, 203 (1957).

Permethylierung des reduzierten Hauptsaponins PS 4

a) Nach Kuhn^{10, 18)}: 200 mg reduziertes Hauptsaponin wurden in 2 ml warmem DMF gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemp. fügte man 1 ml Methyljodid und im Verlauf von 15 min portionsweise 1 g frisch bereitetes Ag₂O zu. Dann schüttelte man 12 h auf der Maschine, filtrierte anschließend vom ausgefallenen Silberjodid ab und wusch mit wenig DMF und danach mit Chloroform nach. Das Filtrat wurde mit 5proz. wäbr. Kaliumcyanid-Lösung versetzt. Die wäbr. Phase wurde noch 4 mal mit Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen 4 mal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingedampft. Das Dünnschichtchromatogramm im System G zeigte eine Vielzahl von Produkten. Man erhielt 225 mg Substanzgemisch.

b) Nach Hakomori¹¹⁾: Zur Vervollständigung der Permethylierung wurde nach Hakomori verfahren. Zu den oben erhaltenen 225 mg untermethylierter Substanz in 10 ml DMSO fügte man die frisch bereitete starke Base Methylsulfinylnatrium in DMSO hinzu. Nach 12 h Rühren unter Luftausschluß gab man 1 ml Methyljodid zu und ließ noch 2 h rühren. Danach wurde die Reaktionsmischung in 100 ml Eiswasser gegossen und 5 mal mit je 100 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden 3 mal mit je 50 ml Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Nach Abtrennung von DMSO über Kieselgel zeigte das IR-Spektrum keine OH-Bande mehr. Durch Säulenchromatographie (30-g-Säule) im System F wurden 230 mg permethyliertes Produkt erhalten.

Hydrolyse des permethylierten Produktes: 200 mg permethyliertes Hauptsaponin wurden in 25 ml 5proz. methanol. Salzsäure 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Lösung mit Wasser auf das doppelte Vol. verdünnt und vom ausgefallenen Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 20 ml 2 N HCl aufgenommen und erneut 3 h bei 100°C hydrolysiert. Anschließend wurde mit Ionenaustauscher Dowex-3 (OH-Form) neutralisiert und wiederum zur Trockene eingengt. Man erhielt 105 mg Methylzuckergemisch, das über eine 10-g-Säule in den Systemen O aufgetrennt wurde. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Auftrennung erfolgte in den Systemen P mit den entsprechenden methylierten Zuckern als Vergleich. Es wurden im wesentlichen vier Methylzucker erhalten: 25 mg 2,3,4-Tri-O-methylrhannose, 20 mg 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose, 16 mg 2,3,4-Tri-O-methylgalactose, 12 mg 3,6-Di-O-methylglucose.

Die Identifizierung der erhaltenen Methylzucker erfolgte papierchromatographisch nach der aufsteigenden Methode im System L¹⁵⁾ mit authentischen Methylzuckern als Vergleich.

2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose: $R_{gluc} = 1$ (System L) (willkürlich als Referenz). Nadelchen vom Schmp. 90–91°C (Ether/Petrolether 40–60°C). $[\alpha]_D^{20} = +87^\circ \rightarrow +79^\circ$ ($c = 1$; H₂O). Lit.¹⁹⁾: Schmp. 96°C; $[\alpha]_D^{20} = +92^\circ \rightarrow +84^\circ$.

Misch-Schmp. und chromatographisches Verhalten zeigten keine Abweichungen von authentischem Material.

2,3,4-Tri-O-methylrhannose: Schwach gelber Sirup. Identifizierung als Anilid: Eine Spatelspitze des erhaltenen Sirups von 2,3,4-Trimethylrhannose in 2 ml absol. Methanol wurde mit 0,4 ml frisch destilliertem Anilin und 2 mg Ammoniumchlorid 2 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Verdünnen mit Wasser wurde 3 mal mit je 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Der i. Vak. zur Trockene gebrachte Chloroformauszug wurde an 20 g Kieselgel chromatographiert. Elution mit Cyclohexan/Aceton (10:1) ergab 7 mg Anilid vom Schmp. 123–125°C (Ether/Petrolether). Nach Misch-Schmp. und chromatographischem Verhalten war die Verbindung identisch mit authentischem Material.

¹⁸⁾ B. Helferich und W. Klein, Liebigs Ann. Chem. 450, 219 (1926).

¹⁹⁾ J. C. Irvine und J. W. H. Oldham, J. Chem. Soc. 1921, 119, 1744.

2,3,4-Tri-O-methylgalactose: $R_{\text{gluc}} = 0.23$ (System L), farbl. Sirup. $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +136^{\circ} \rightarrow +119^{\circ}$. Lit.²⁰⁾: $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +152^{\circ} \rightarrow +114^{\circ}$ ($c = 1.0$; H_2O).

3,6-Di-O-methylglucose: $R_{\text{gluc}} = 0.08$ (System L), farbl. Nadelchen mit Schmp. 115–117°C (Essigester). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +60.8^{\circ}$ (Enddrehung, $c = 1.01$; H_2O). Lit.²¹⁾: Schmp. 113–116°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +102.5^{\circ} \rightarrow +61.5^{\circ}$ ($c = 3.2$; H_2O). Misch-Schmp. und R_{F} -Wert stimmten mit authentischem Material überein.

Partialhydrolyse des reduzierten Hauptsaponins: 100 mg reduziertes Hauptsaponin wurden mit 20 ml 0.5 N HCl in 50proz. Methanol 1 h unter Rückfluß erhitzt. Der Alkohol wurde i. Vak. abgezogen, Wasser zugefügt und die ausgefallenen Produkte abfiltriert. Die wäbr. Phase wurde i. Vak. zur Trockene eingedampft und der Rückstand an Kieselgel im System K aufgetrennt. Neben den Monosacchariden Rhamnose und Glucose wurden 25 mg Oligosaccharid und 50 mg unpolares Glycosid erhalten.

a) 5 mg Oligosaccharid wurden 3 h mit 2 N HCl bei 100°C unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen und Neutralisieren der Lösung mit Ionenaustauscher Dowex-3 wurden die erhaltenen Monosaccharide dünnschichtchromatographisch im System M und papierchromatographisch im System H als Glucose und Galactose identifiziert.

Permethylierung und saure Hydrolyse mit anschließender Auftrennung des permethylierten Gemisches an Kieselgel erfolgte wie oben und ergab 8 mg 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose und 5.5 mg 2,3,4-Tri-O-methylgalactose.

b) 7 mg unpolares Glycosid wurden mit 2 N HCl bei 100°C unter Rückfluß erhitzt und nach dem Abkühlen in bekannter Weise aufgearbeitet. Die papierchromatographische Untersuchung der wäbr. Phase in den Systemen H und M ergab, daß bei der Hydrolyse Rhamnose und Glucose, die aus der ursprünglichen Glucuronsäure stammte, entstanden waren.

Die Permethylierung des restlichen Glycosids mit anschließender Hydrolyse ergab nach säulenchromatographischer Trennung die Methylzucker 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose und 3,4,6-Tri-O-methylglucose mit 6 mg bzw. 4 mg Ausbeute. Die Trimethylrhamnose wurde wie oben nachgewiesen.

3,4,6-Tri-O-methylglucose: $R_{\text{gluc}} = 0.40$ (System L). Nadelchen mit Schmp. 83–85°C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +120^{\circ} \rightarrow +79^{\circ}$ ($c = 1.03$; H_2O). Lit.^{22,17)}: Schmp. 77–79°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +122^{\circ} \rightarrow +77.7^{\circ}$ ($c = 1.0$; H_2O). Der Misch-Schmp. mit authentischem Material zeigte keine Depression.

Reduktion, Hydrolyse und Zuckerbestimmung des Nebensaponins PS 3: 200 mg verestertes Nebensaponin PS 3 wurden mit Natriumborhydrid reduziert. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde das Rohprodukt über Kieselgel aufgetrennt (System D) und ergab 152 mg reduziertes Produkt. 50 mg reduziertes Nebensaponin wurden in zwei Fraktionen von je 25 mg aufgeteilt.

a) Der eine Teil wurde in 10 ml 2 N HCl 4 h bei 100°C hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde vom ausgefallenen Niederschlag abfiltriert, über Ionenaustauscher neutralisiert und sowohl dünnschicht- als auch papierchromatographisch auf Monosaccharide untersucht (Systeme A, K, M für DC und H, I, M, N für PC). Es konnten die Zucker Rhamnose, Glucose und Galactose nachgewiesen werden.

b) Der andere Teil wurde in 10 ml 5proz. methanol. Salzsäure 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Verdünnen mit Wasser wurden die ausgefallenen Produkte abgetrennt. Die wäbr. Phase wurde neutralisiert, i. Vak. zur Trockene eingengt und der Rückstand zur Entfernung des Wassers mehrmals mit wenig Benzol eingedampft. Die erhaltenen O-Methyl-glycoside wurden in bekannter

²⁰⁾ F. Smith, J. Chem. Soc. 1939, 1724.

²¹⁾ D. J. Bell, J. Chem. Soc. 1935, 175.

²²⁾ P. A. J. Gorin, J. F. T. Spencer und A. P. Tulloch, Can. J. Chem. 39, 846 (1961).

Weise silyliert und das silylierte Glycosidgemisch gaschromatographisch quantitativ bestimmt. Man erhielt ein Zuckerverhältnis Rhamnose:Glucose:Galactose = 1:2:1.

Hydrolyse des Primula-Saponingemisches: 250 mg verestertes Saponingemisch wurden mit 25 ml 5proz. methanol. Salzsäure 4 h hydrolysiert. Nach Verdünnen mit Wasser wurden die ausgefallenen Produkte abfiltriert und die wäbr. Phase i. Vak. eingedampft. Nach Zugabe von 10 ml 2 N HCl wurde 2 h bei 100°C nachhydrolysiert, mit Ionenaustauscher neutralisiert, die Lösung eingeeengt und mit DC und PC auf Monosaccharide untersucht. Man erhielt als Zucker nur Rhamnose, Glucose, Galactose und Glucuronsäure. Die säulenchromatographische Trennung erfolgte im System M.

Reduktion, Permethylierung und Hydrolyse des Saponingemisches: 1 g verestertes Saponingemisch wurde mit Natriumborantat reduziert. Nach der Aufarbeitung und Reinigung über Kieselgel wurden 790 mg reduziertes Saponingemisch erhalten. Das reduzierte Saponingemisch wurde zuerst nach Kuhn^{10,18)} vormethyliert und anschließend nach Hakomori¹¹⁾ bis zur Vollständigkeit weitermethyliert. Auch nach mehrmaligem Nachmethylieren waren neben einem intensiven Fleck noch mehrere schwächere Flecke von geringerer und größerer Polarität nach DC-Untersuchung sichtbar. Der Hauptfleck wurde über Kieselgel isoliert (System F; 680 mg). Die Hydrolyse erfolgte zunächst mit 100 ml 5proz. methanol. Salzsäure und anschließend mit 50 ml 2 N HCl. Das erhaltene Methylzuckergemisch (210 mg) wurde wie oben beschrieben an Kieselgel im System O aufgetrennt. Man erhielt so 24 mg 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose, 28 mg 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose, 12 mg 2,3,4-Tri-O-methylgalactose und 8 mg 3,6-Di-O-methylglucose, deren Identifizierung wie oben erfolgte.

[426/76]