

Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette, XI¹⁾

Desgluco-avenacosid-A und -B, biologisch aktive Nuatigeninglycoside

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 Avenacosiden-A und -B des Hafers (*Avena sativa*) wird durch Inkubation mit einem wasserunlöslichen Enzym der Blätter die in der Seitenkette am 26-ständigen OH gebundene Glucose abgespalten, und es werden ohne Umlagerung zur Isoform die entsprechenden Nuatigeninglycoside erhalten. Die Desgluco-avenacoside-A und -B sind sowohl hämolytisch wie antibiotisch wirksam.

Steroid Saponins with More than One Sugar Chain, XI¹⁾

Desgluco-avenacosid-A and -B, Biologically Active Nuatigenin Glycosides

The avenacosides A and B from the oat (*Avena sativa*) split off glucose with a water insoluble enzyme of the leaves from OH at C-26 and give without rearrangement to the iso form the corresponding nuatigenin glycosides. The desgluco-avenacosides A and B show as well hemolytic as antibiotic activity.

1966 konnten wir erstmals über die Isolierung von zwei Glycosiden aus den oberirdischen Teilen des Hafers (*Avena sativa*) berichten²⁾, die als Avenacoside-A und -B bezeichnet und deren Struktur als bisdesmosidische Glycoside mit Nuatigenin als Aglycon ermittelt wurde^{3, 4)}.

Beide waren erwartungsgemäß hämolytisch und antibiotisch inaktiv. Es war daher auf Grund einer Beobachtung von H. U. Lüning überraschend, daß Haferblätter beim Zerkleinern unter Wasser einen biologisch aktiven Extrakt liefern, und es war zu vermuten, daß diese ein wasserunlösliches Enzym enthalten, durch das die Aktivierung hervorgerufen würde. Die Isolierung der aktiven Substanzen bestätigte diese Annahme: es handelte sich um die entsprechenden Desgluco-avenacoside-A (2) und -B (1), welche die D-Glucose am OH an C-26 verloren haben.

Die Isolierung erfolgte nach Inkubation der zerkleinerten Blätter und Abfiltrieren des wasserunlöslichen Anteils der Pflanzen durch Butanol-Extraktion und Reinigung des extrahierten Materials durch Säulenchromatographie an Silikagel. Die Erfahrungs-

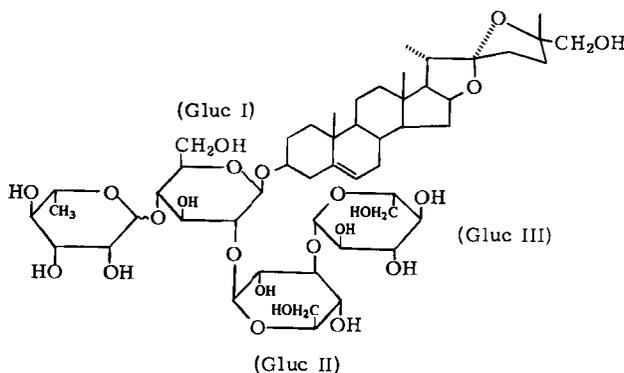
¹⁾ X. Mittel.: R. Tschesche und H. Gutwinski, Chem. Ber. 108, 265 (1975).

²⁾ R. Tschesche und W. Schmidt, Z. Naturforsch., Teil B, 21, 896 (1966).

³⁾ R. Tschesche, M. Tauscher, H.-W. Fehlhaber und G. Wulff, Chem. Ber. 102, 2072 (1969).

⁴⁾ R. Tschesche und P. Lauen, Chem. Ber. 104, 3549 (1971).

werte für die Inkubationszeit betragen bei Raumtemperatur $1\frac{1}{2}$ –2 h. Die Ausbeuten konnten erhöht werden, wenn bei 30–35°C inkubiert wurde. Dabei entstanden zwei gegenüber den Avenacosiden unpolare, jedoch nicht kristallisierbare Verbindungen; sie wurden als Desgluco-avenacosid-A bzw. -B bezeichnet. Desgluco-avenacosid-A wurde schon früher³⁾ in schlechter Ausbeute aus Avenacosid-A mit einem Enzympräparat aus *Asp. welchii* erhalten. Die quantitative Zuckerbestimmung von Desgluco-avenacosid-A ergab ein Verhältnis von Rhamnose zu Glucose wie 2:1 und bei Desgluco-avenacosid-B von 3:1⁵⁾. Permethylierung von Desgluco-avenacosid-A und anschließende Hydrolyse ergab die Methylzucker 2,3,4-Tri-*O*-methyl-L-rhamnose sowie 3,6-Di-*O*-methyl-D-glucose und 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose. Bei Desgluco-avenacosid-B wurde darüber hinaus eine 2,4,6-Tri-*O*-methyl-D-glucose gefunden. Dieses Ergebnis sichert den Aufbau der Zuckerkette an C-3 als dem der ursprünglichen Avenacoside entsprechend. Wäre mit der Zuckerkette an C-3 bei der Enzymeinwirkung eine Veränderung eingetreten, hätten andere Methylzucker auftreten müssen.



1: 26-Desgluco-avenacosid-B

2: 26-Desgluco-avenacosid-A = B - Gluc III

Die Permethylierung⁶⁾ erbrachte zusätzlich eine Einführung von Methyl an das OH, das durch Abspaltung der Glucose in der Seitenkette des Aglycons freigeworden war. Eine solche Methylverbindung sollte sich vermutlich nur dann bilden, wenn die Nuatigeninform des Aglycons vorliegt, denn im Isonuatigenin, entstanden durch Umlagerung, ist nur ein tert. Hydroxyl vorhanden. Durch Hydrolyse mit 5proz. Salzsäure konnte daraus der Nuatigenin-26-methylether kristallisiert erhalten werden. Sein Massenspektrum zeigte ein Molekülion von m/e 444, entsprechend der Zusammensetzung $C_{28}H_{44}O_4$. Die intensivsten Fragmentpeaks bei m/e 399 und 169 lassen sich durch Abspaltung eines CH_2OCH_3 -Radikals (Ion a) bzw. dem Bruchstück-Ion d erklären³⁾. Damit kann kein Zweifel sein, daß von dem partikelständigen Enzym der Haferblätter die 26-ständige Glucose entfernt worden ist.

⁵⁾ G. Wulff, J. Chromatogr. **18**, 285 (1965).

⁶⁾ R. Kuhn, H. Egge, R. Brossmer, A. Gauke, W. Lochinger, E. Röhm, H. Frischmann und D. Tschampel, Angew. Chem. **72**, 805 (1960); R. Kuhn, H. Frischmann und I. Löw, ebenda **67**, 32 (1955).

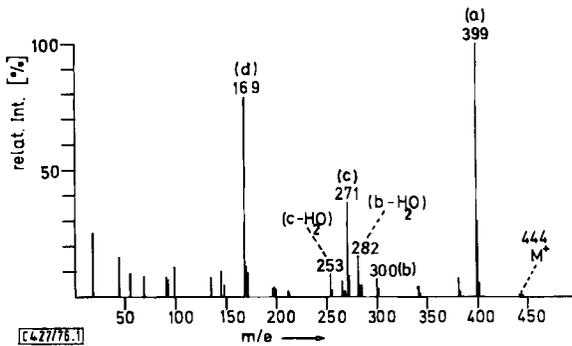
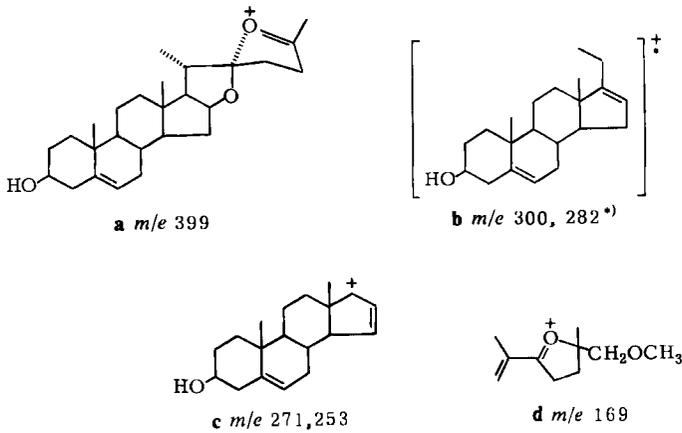
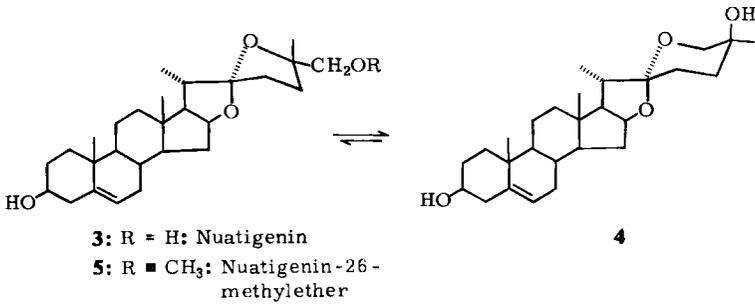


Abb. 1. Massenspektrum von Nuatigenin-26-methylether

Damit ist zugleich auch gesichert, daß Nuatigenin (3) genuines Aglycon der Avenaside ist. Während bei der Säurehydrolyse bzw. der Einwirkung von β -Glucosidasen aus niederen Pilzen stets ein Gemisch von Nuatigenin und viel Isonuatigenin (4) ent-

^{*)} Diese Massenzahl bezieht sich auf ein Fragment-Ion, bei dem zusätzlich der 3 β -Substituent als H₂O abgespalten wurde.

stand, letzteres gebildet durch sekundäre Umlagerung^{7,8)}, gelang es durch das Enzym der Haferblätter erstmals monodesmosidische Nuatigeninglycoside in Form des Desgluco-avenacosids-A, bzw. -B zu erhalten. Sie wären zu bezeichnen: A als (22S,25S)-22,25-Epoxy-3 β ,26-dihydroxy-3-O- $\{[L\text{-rhamnopyranosyl-(1} \rightarrow 4)]\text{-}[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1} \rightarrow 2)]\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}\}$ - Δ^5 -furosten bzw. B als (22S,25S)-22,25-Epoxy-3 β ,26-dihydroxy-3-O- $\{[L\text{-rhamnopyranosyl-(1} \rightarrow 4)]\text{-}[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1} \rightarrow 3)]\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1} \rightarrow 2)]\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}\}$ - Δ^5 -furosten.

Ihre biologische Wirksamkeit ergibt sich wie folgt:

a) Hämolytische Aktivität der Avenacoside.

Glycoside	$\mu\text{g/ml}$ zur vollständigen Hämolyse ^{*)}
Avenacosid-A	> 1000
Avenacosid-B	> 1000
26-Desgluco-avenacosid-A	9
26-Desgluco-avenacosid-B	3

^{*)} Die vollständige Hämolyse wurde visuell an einer 0.1proz. Erythrozytensuspension bestimmt.

b) Für die Bestimmung der antimykotischen Aktivität der Glycoside wurde als Maß für die Schädigung (Einfluß auf die selektive Permeabilität des Pilzmycels) die Gesamtmenge der in das Inkubationsmedium abgegebenen freien Aminosäuren bestimmt. Je Test wurden 2 g gewaschenes Pilzmyzel in 10 ml dest. Wasser suspendiert und mit 200 μg Glycosid pro ml für 2 h auf einem Schüttler inkubiert. Die Inkubationsflüssigkeit wurde durch Filtrieren gewonnen und die in ihr vorhandenen freien Aminosäuren nach Reaktion mit Ninhydrin-Reagenz im Spektralphotometer bei 570 nm als Asparaginäquivalent bestimmt.

Pilz	Kontrolle	Avenacosid-B	26-Desgluco-avenacosid-B
	Asparagin-Äquivalente in $\mu\text{g/ml}$		
<i>Ascochyta pisi</i>	0	0	525
<i>Helminthosporium graminearum</i>	0	0	107
<i>Helminthosporium teres</i>	0	0	176
<i>Cereosporella herpotrichoides</i>	0	0	652
<i>Fusarium avenaceum</i>	0	0	625
<i>Ophiobolus graminis 105</i>	0	0	530
<i>Ophiobolus graminis 301</i>	0	0	565
<i>Ophiobolus graminis avenae 59</i>	0	0	1475
<i>Ophiobolus graminis avenae 60</i>	0	0	1500
<i>Septoria nodorum</i>	0	0	85

Aus der Tabelle geht hervor, daß der Einfluß auf die selektive Permeabilität des Pilzmycels allein auf das 26-Desgluco-avenacosid B zurückzuführen ist.

⁷⁾ R. Tschesche und K. H. Richert, *Tetrahedron* **20**, 378 (1964).

⁸⁾ W. Schmidt, Dissertation, Univ. Bonn 1966.

Die Desgluco-avenacose-A und -B zeigen keinen bitteren Geschmack im Gegensatz zu den Avenacosen selbst.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dipl.-Ing.-agr. *H.-U. Lüning*, am Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn, für die Durchführung der hämolytischen und antimykotischen Tests danken.

Auskunft über die Ergebnisse eines pharmakologischen Screenings mit den Desgluco-avenacosen gibt Herr Dr. *B. Guerin*, rue de l'Ecole de Mars, 92 Meully-624.07-81, Frankreich.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Mikroskopheiztisch nach Kofler-Weygand. Optische Drehungen: Perkin-Elmer Polarimeter 141. IR-Spektren: Spektrophotometer Perkin-Elmer, Modell 221 mit Gitter-Prismen-Austauscheinheit. Massenspektrum: Gerät CH 4 der Atlas-MAT-GmbH im Direkt-Einlaßverfahren bei 70 eV Elektronenenergie. Die C,H-Analysen sind im Mikroanalytischen Laboratorium Dr. F. Pascher, Bonn, angefertigt worden. Die Dünnschicht-Chromatographie (DC) an Kieselgel G (Merck) wurde wie üblich ausgeführt⁹⁾. Angefärbt wurde mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1:2) für Saponine und Sapogenine oder mit Anilinphthalat in Isobutanol¹⁰⁾ für Zucker und Methylzucker. Zur Säulenchromatographie benutzte man Kieselgel der Fa. Gebr. Herrmann, Köln.

Folgende Systeme bewährten sich als Laufmittel:

A Chloroform/Methanol/Wasser	65 : 35 : 10/65 : 30 : 10 (jeweils die untere Phase)
B Chloroform/Methanol/Wasser	64 : 30 : 6
C Chloroform/Methanol/Wasser	65 : 15 : 2
D Chloroform/Methanol/Wasser	65 : 10 : 5 (untere Phase)
E Benzol/Methanol	10 : 1
F Benzol/Aceton	10 : 1/10 : 2/10 : 4/3 : 2/1 : 1

Gaschromatographie: Gerät F 7 von Perkin-Elmer mit Integrator D 2 und Kienzle Digitaldrucker. Für die enzymatischen Spaltungen benutzte man Enzymgemische am *Aspergillus* Spezies (E. L. 27–67 von Röhm et Haas).

Sowohl 26-Desgluco-avenacoseid-B als -A konnten nicht zur Kristallisation gebracht werden. Die C,H-Analysen der amorphen Substanzen ergaben:

A: $C_{45}H_{72}O_{18} \cdot H_2O$ (918.6) Ber. C 58.85 H 8.08 Gef. C 58.66 H 8.19

B: $C_{51}H_{82}O_{23} \cdot 2H_2O$ (1098.7) Ber. C 55.35 H 7.86 Gef. C 55.25 H 7.77

Die Konstitution ist gesichert durch die quantitative Bestimmung des Verhältnisses Glucose/Rhamnose (3:1 bzw. 2:1), durch die Hydrolyse der permethylierten Glycoside und die massenspektrometrische Bestimmung der Verbindung 5.

Isolierung der Saponine: Etwa 1.8 kg Haferblätter von 9–10 Tage alten Pflanzen wurden mit 3 Liter dest. Wasser versetzt und im Ultraturax fein zerkleinert. Wegen starker Schaumbildung mußte der Vorgang mehrmals unterbrochen werden. Im Laufe der Zerkleinerung setzte man noch ca. 1–1½ Liter dest. Wasser zu, so daß die Lösung schließlich ca. 5 Liter ausmachte. Danach ließ man die Suspension ca. 1–1½ h bei Raumtemp. stehen. (Es ist darauf zu achten, daß bei Raumtemp. aufgearbeitet wird, d. h. sowohl Pflanzen als auch Wasser sollten Raumtemp. besitzen.) Man filtrierte über ein feines Baumwollgewebe und wusch mit dest. Wasser nach. Das

⁹⁾ R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).

¹⁰⁾ S. M. Partridge, Nature (London) **164**, 443 (1949).

von Chlorophyll und anderen Farbstoffen stark gefärbte Filtrat wurde zur Entfernung der unpolaren Anteile mit Petrolether (60–90°C) (5 mal mit jeweils 500 ml) ausgeschüttelt. Die wäbr. Phase wurde anschließend 4 mal mit je 500 ml n-Butanol ausgezogen. Die vereinigten Butanolphasen wurden in kleinen Portionen mit insgesamt 1 Liter Wasser gewaschen und ergaben nach Eindampfen i. Vak. bei 45°C (Badtemp.) 45 g Rohsaponin. Zur Vorreinigung passierten sie, auf 100 g Kieselgel aufgezogen, eine 2½-kg-Kieselgelsäule (Elutionsmittel System B). Man erhielt etwa 6 g angereicherte Substanzen B und A, beide noch leicht gelb gefärbt.

Zur Reinigung und vollständigen Trennung wurde erneut auf 12 g Kieselgel aufgezogen und über eine 500-g-Säule geschickt (Elutionsmittel System C). Man erhielt 2.4 g Substanz B und 1.1 g Substanz A. Es zeigte sich jedoch, daß beide Substanzen immer noch durch einen gelblichen Farbstoff verunreinigt waren. Selbst durch Änderung der Polarität des Elutionsmittels konnte anhand der Dünnschichtchromatographie keine befriedigende Trennung vom Farbstoff erzielt werden. Nach Einengen im Rotationsverdampfer i. Vak. bis zur Trockne und erneutem Aufnehmen in wenig Methanol erwies sich der Farbstoff im Gegensatz zu B und A als gut in Methanol löslich. Damit war es möglich, die Saponine rein zu erhalten: sie wurden abfiltriert, mit wenig Methanol gewaschen und die vereinigten Filtrate nochmals bis zur Trockne eingedampft. Danach wurde nochmals mit wenig Methanol aufgenommen und der Vorgang wie zuvor wiederholt. Mehrmalige Wiederholung dieser Prozedur ergab schließlich 1.62 g reines B und 570 mg A, ein Verhältnis also von ca. 3:1, analog dem der bisdesmosidischen Saponine Avenacosid-B und -A³⁾.

*Methylierung*⁶⁾: 267 mg 26-Desgluco-avenacosid-B wurden in 20 ml warmem DMF gelöst und bei Raumtemp. mit 2 ml Methyljodid versetzt. Unter starkem Rühren trug man im Laufe von etwa 20 min 2 g Ag₂O ein¹¹⁾. Dabei stieg die Temperatur kaum an, so daß auf eine Kühlung verzichtet werden konnte. Die Zugabe von Ag₂O und Methyljodid wurde nach 15 h wiederholt, insgesamt 3 mal, nach 3 Tagen war die Methylierung beendet. Das Fortschreiten der Reaktion konnte dünn-schichtchromatographisch (System E), besser aber im IR-Spektrum durch Verschwinden der breiten OH-Bande verfolgt werden. Nach beendeter Reaktion wurde der Bodenkörper abfiltriert und mit jeweils 2 ml DMF und Chloroform gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit 150 ml Wasser und 1 g Kaliumcyanid versetzt und 4- bis 5 mal mit je 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformauszüge wurden vereinigt, 3- bis 4 mal mit je 20 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet: 534 mg eines gelben Öls. Nach Aufziehen auf 1.5 g Kieselgel ergab die Reinigung des permethylierten Produkts an einer 60-g-Säule (Elutionsmittel System E) 304 mg reines permethyliertes 26-Desgluco-avenacosid-B.

Isolierung und Identifizierung der Zucker und des Aglycons: 304 mg permethyliertes Material wurden mit 15 ml 5proz. methanol. Salzsäure versetzt und 6 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde mit 30 ml Wasser verdünnt, das Methanol i. Vak. abdestilliert und der Niederschlag abfiltriert (105 mg). Nach Auflösen in wenig warmem Methanol und Einengen am Rotationsverdampfer bis zur Trockne wurde der Rückstand aus Methanol/Petrolether (60/90°C) umkristallisiert. Nach kurzer Zeit schieden sich feine Nadelchen (60 mg) vom Schmp. 190–194°C ab, deren Massenspektrum eindeutig auf Nuatigenin-26-methylether hinwies.



Das oben erhaltene wäbr. Filtrat wurde auf 15 ml eingeengt, mit 15 ml 2 N HCl versetzt und 15 h unter Rückfluß erhitzt, um die gebildeten Methylglycoside zu hydrolysieren. Danach waren dünn-schichtchromatographisch im System D vier mit Anilinphtalal anfärbbare Zucker nachweisbar. Mit Ionenaustauscher (Dowex 3, OH-Form) wurde die Säure neutralisiert, die Lösung

¹¹⁾ B. Helferich und W. Klein, Liebigs Ann. Chem. 450, 219 (1926).

i. Vak. eingedampft und das resultierende Methylzuckergemisch (210 mg) über eine 10-g-Kieselgel-säule mit Benzol/Aceton-Gemischen steigender Polarität (System F) chromatographiert. Man erhielt 36 mg 2,3,4-Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose, 51 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose, 45 mg 2,4,6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose und 25 mg 3,6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose. Identifiziert wurden die Zucker wie folgt:

2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose kristallisierte aus Petrolether in schönen langen Nadeln, die nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Petrolether Schmp. 90–92°C zeigten. $[\alpha]_D^{20}$: +77.6° (Enddrehung, $c = 1.03$, Wasser). Nach Mischprobe und chromatographischem Verhalten war die Verbindung identisch mit authentischem Material.

2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose: Schmp. 120–122°C (Ether/Petrolether), $[\alpha]_D^{20}$: +60.1° (Enddrehung, $c = 1.01$, Wasser). Mischprobe und chromatographisches Verhalten erwiesen Identität mit authentischem Material.

3,6-Di-O-methyl-D-glucose: Schmp. 115–117°C (Essigester). $[\alpha]_D^{20}$: +60.6° (Enddrehung, $c = 1.02$, Wasser). Nach Mischprobe und chromatographischem Verhalten war die Verbindung mit authentischem Material identisch.

2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose als Anilid: Der erhaltene Sirup von Tri-*O*-methyl-*L*-rhamnose wurde in 5 ml absol. Methanol mit 0.1 ml Anilin und 5 mg NH₄Cl 2 h unter Rückfluß gekocht. Nach Verdünnen mit Wasser schüttelte man 3 mal mit je 50 ml Chloroform aus.

Die weitere Reinigung an einer 20-g-Kieselgelsäule im System F (10:1) ergab das Anilid mit Schmp. 122–124°C (Ether/Petrolether), nach Mischprobe und chromatographischem Verhalten identisch mit authentischem Material.

*Quantitative Zuckerbestimmung*⁵⁾: 230 mg 26-Desgluco-avenacosid-B wurden mit 45 ml 5 proz. methanol. HCl 6 h unter Rückfluß gekocht. Nach Erkalten der Lösung wurde mit 30 ml Wasser verdünnt, das Methanol abgezogen und das Aglycongemisch abfiltriert. Es ergaben sich 40 mg Aglycongemisch, nämlich wenig Nuatigenin und vorwiegend Isonuatigenin, deren Trennung und Reinigung über die Acetate⁷⁾ erfolgte (System E).



Nuatigenindiacetat: 17 mg kleine Nadeln mit Schmp. 156–160°C (Methanol).

Isonuatigenindiacetat: 41 mg kleine Nadeln mit Schmp. 209–212°C.

Isonuatigenin: Schmp. 216–219°C²⁾.

Nuatigenin: Schmp. 247–250°C²⁾.

Zur Hydrolyse der Methylglycoside zog man das Lösungsmittel bis auf 20 ml ab, gab dann 5 ml 2 N HCl zu und erhitzte 2 h auf 100°C. Die erkaltete Lösung wurde mit Dowex 3 (OH-Form) neutralisiert und bis zur Trockne i. Vak. eingengt. 5 mal wurde mit wenig Benzol (insgesamt 5 ml) versetzt und zur Trockne eingedampft, um das Wasser vollständig zu vertreiben. Den Rückstand (190 mg) löste man in 1 ml wasserfreiem Pyridin und fügte 0.5 ml Hexamethyldisilazan und 0.5 ml Chlortrimethylsilan zu. Der Silylierungsansatz wurde noch 1 h unter Rückfluß auf 95°C erhitzt, da sich so das sirupöse Zuckergemisch in Pyridin besser umsetzte und der gebildete Niederschlag von NH₄Cl bei der weiteren Aufarbeitung sich besser abfiltrieren ließ. Die Lösung wurde bei 60°C am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, 2 mal mit wasserfreiem Benzol abgedampft und der Rückstand in 2 ml wasserfreiem Benzol aufgenommen. Nach Filtrieren und Waschen mit weiteren 2 ml Benzol wurde wieder eingengt. Die gaschromatographische Bestimmung der Silylverbindungen ergab ein molares Verhältnis Glucose/Rhamnose von 3:1 (Vergleich mit einer entsprechenden Blindprobe).

Analog wurde mit dem 26-Desgluco-saponin-A verfahren. Verhältnis 2:1.

Enzymatische Spaltung von 26-Desgluco-avenacosid-B (-A): Einige Milligramm 26-Desgluco-avenacosid-B (-A) wurden in 20 ml Wasser gelöst, mit dem Enzymgemisch E. L. 27-67 (Röhm et Haas) versetzt und der Ansatz 4 Tage im Brutschrank bei 39°C gehalten. Danach zeigten sich im DC (System E) im wesentlichen zwei dicht übereinander liegende Flecke, die sich als Nuatigenin bzw. Isonuatigenin erwiesen. Nach Denaturierung der Enzyme mit 30 ml Methanol und kurzem Aufkochen waren durch Säulenchromatographie beide Substanzen zusammen erhältlich. Die weitere Trennung über die Acetate⁷⁾ ergab 7.3 mg Isonuatigenindiacetat und 3.9 mg Nuatigenindiacetat.

[427/76]