

Über Triterpene, XXXIII<sup>1)</sup>

## Über das Saponin der Blüten von *Verbascum phlomoides* L.

Rudolf Tschesche\*, Silvia Sepúlveda und Thomas M. Braun

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

Eingegangen am 17. August 1979

---

Die Blüten von *Verbascum phlomoides* L. liefern das Saponin Verbascosaponin (**1**),  $C_{54}H_{90}O_{22}$ , das als Aglycon Verbascogenin,  $C_{30}H_{50}O_4$ , mit einer Doppelbindung enthält. Bei Säureeinwirkung entsteht das bekannte Triterpen A (**2**) mit der Summenformel  $C_{30}H_{48}O_3$  und zwei Doppelbindungen<sup>2,3)</sup>. Im Glycosid wurden vier Zucker gefunden – 2 D-Glucose, 1 L-Rhamnose und 1 D-Fucose – und die Art ihrer Verknüpfung bestimmt.

**Triterpenes, XXXIII<sup>1)</sup>**

### On the Saponin of the Flowers of *Verbascum phlomoides* L.

From the flowers of *Verbascum phlomoides* L. a saponin verbascosaponin (**1**),  $C_{54}H_{90}O_{22}$ , was isolated containing as aglycone verbascogenin,  $C_{30}H_{50}O_4$ , with one double bond. At acidic conditions it is transformed into the known triterpene A (**2**),  $C_{30}H_{48}O_3$ , with two double bonds<sup>2,3)</sup>. Four sugar units were found in the glycoside – 2 D-glucose, 1 L-rhamnose and 1 D-fucose. The sequence of the sugar chain was determined.

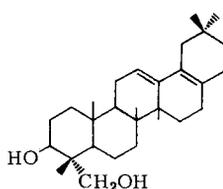
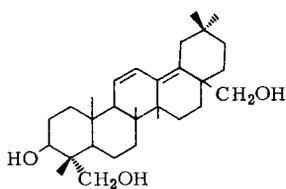
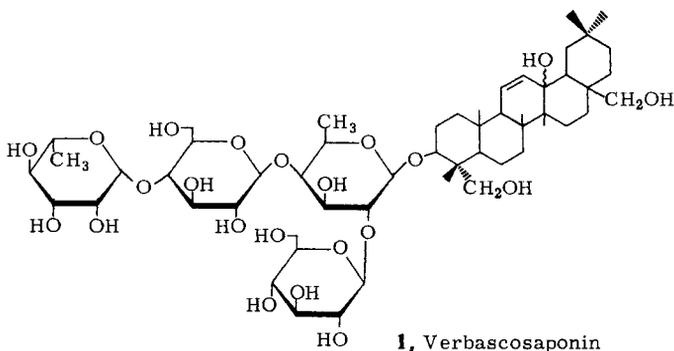
---

Aus den Blüten von *Verbascum phlomoides* L. wurde das Saponin Verbascosaponin (**1**),  $C_{54}H_{90}O_{22}$ , isoliert; das Aglycon Verbascogenin,  $C_{30}H_{50}O_4$ , enthält nur eine Doppelbindung. Bei Säureeinwirkung liefert es das bekannte Triterpen A (**2**) mit zwei Doppelbindungen und der Summenformel  $C_{30}H_{48}O_3$ <sup>2,3)</sup>. Der Vorgang läßt sich als säurekatalysierte Wasserabspaltung an C-13/C-18 unter Ausbildung einer zweiten Doppelbindung deuten. Das genuine Aglycon Verbascogenin konnte wegen seiner großen Säurelabilität nicht isoliert werden, seine Konstitution wurde daher durch <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie des Verbascosaponins (**1**) bestimmt. Die C-Atome von Verbascogenin konnte man anhand der Verschiebungen und Multiplizitäten bei <sup>1</sup>H-Off-Resonance-Entkopplung vollständig zuordnen (Tab. 1).

Verbascosaponin (**1**) wurde unter Einwirkung von 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> schon nach 5 min in ein anderes Glycosid umgewandelt, das nach <sup>13</sup>C-NMR- und UV-Spektren zwei Doppelbindungen enthält. Die im Verbascosaponin beobachtete hämolytische Aktivität ließ sich dann nicht mehr nachweisen<sup>4)</sup>.

Nach der Totalhydrolyse des Verbascosaponins mit 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde neben dem Triterpen A (**2**) auch das Triterpen B (**3**),  $C_{29}H_{46}O_2$ , isoliert, die schon in der Arbeit über das Saponin aus *Scrophularia smithii* W. beschrieben worden sind<sup>2)</sup>.

Die Zuordnung der <sup>13</sup>C-NMR-Signale von Verbascogenin und Triterpen A (**2**) kann Tab. 1 entnommen werden. Unterschiedliche chemische Verschiebungen wurden nur für die C-Atome 13, 18 und 19 beobachtet.



Die C-Atome 11 und 12 des Aglycons A (**2**) zeigen eine Verschiebung von ca. 5 ppm gegenüber Verbascogenin zu höherem Feld; das entspricht dem Konjugationseffekt mit der neuen Doppelbindung im Aglycon A zwischen den C-Atomen 13 und 18.

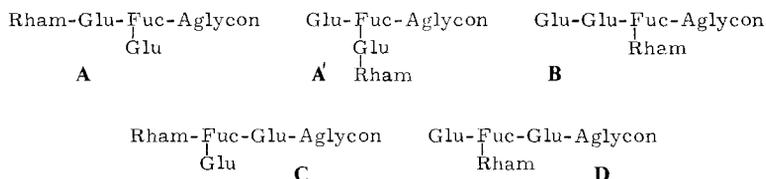
Ähnliche Verbindungen beschrieben auch *Tori et al.*<sup>5)</sup> Im Unterschied zu Verbascogenin weisen die dort untersuchten Saikogenine-F und -G (bzw. die entsprechenden Saponine a und d) einen zusätzlichen Epoxidring zwischen den C-Atomen 13 und 28 auf. Daher differieren die <sup>13</sup>C-NMR-Signale gegenüber unserer Verbindung bei den C-Atomen 18 und 19.

Für eine  $\alpha$ -Konfiguration der OH-Gruppe an C-13 spricht die glatte Abspaltung von Wasser zur Ausbildung der  $\Delta^{13,18}$ -Doppelbindung im Aglycon A (**2**); sie konnte jedoch nicht streng bewiesen werden.

Um die Bausteine der Zuckerkette zu bestimmen, wurde das Verbascosaponin (**1**) mit 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hydrolysiert; nach Abfiltrieren des Aglycons und Neutralisieren der sauren Lösung mit Bariumcarbonat konnten die Zucker durch Papierchromatographie in den Systemen D<sup>6)</sup> und E<sup>7)</sup> als D-Glucose, L-Rhamnose und D-Fucose identifiziert werden. Zur quantitativen Bestimmung der Monosaccharide wurde die Zuckermischung persilyliert und durch Gaschromatographie das Zucker Verhältnis Glucose: Rhamnose: Fucose = 2:1:1 gefunden<sup>8,9)</sup>.

Zur Bestimmung der Verknüpfung der Zuckerkette wurde das Saponin nach *Hakomori*<sup>10)</sup> permethyliert und mit Salzsäure hydrolysiert. Die Methylzucker konnten säulenchromatographisch an Kieselgel getrennt und mit authentischen Substanzen als 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose, 2,3,4-Tri-*O*-methyl-L-rhamnose, 2,3,6-Tri-*O*-methyl-D-glucose und 3-*O*-Methyl-D-fucose identifiziert werden.

Danach ergaben sich nun vier Möglichkeiten A – D der Zuckerverknüpfung.



Eine Unterscheidung zwischen diesen Möglichkeiten konnte über eine Partialhydrolyse des Verbascosaponins mit Ethanol/HCl getroffen werden. Im Hydrolysat fand sich Rhamnose neben einem weniger polaren Partialglycosid. Permethylierung und anschließende Totalhydrolyse ergab nur noch zwei verschiedene Methylzucker: 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-glucose und 3-*O*-Methyl-fucose. Somit kommt nur die Möglichkeit **A** in Betracht; die Möglichkeit **A'** ist zwar nicht auszuschließen, aber wenig wahrscheinlich, da der geninständige Zucker die längere Zuckerkette meist 1 → 4 verknüpft trägt.

Eine definierte enzymatische Spaltung mit verschiedenen Glycosidasen zur Klärung dieser Frage gelang nicht; Verbascosaponin verhält sich Enzymen gegenüber inert. Bei den mineral-sauren Partialhydrolysen wurde immer zuerst die endständige Rhamnose abgespalten, nie die endständige Glucose.

Ob das Saponin aus *Scrophularia smithii* W. analog gebaut ist, bleibt zu klären.

Die Verknüpfungsart der Zucker ( $\alpha$  oder  $\beta$ ) wurde durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie<sup>11,12</sup> ermittelt. Dabei findet man die für 1- $\alpha$ - ( $\delta = 100.7$ ) und 1- $\beta$ -Glycosidbindungen typischen Signale ( $\delta = 103.4, 103.0, 102.0$ ). Daraus ergibt sich für das Hauptsaponin Verbascosaponin (**1**) die Konstitution eines 3-*O*- $\langle$ [ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1→4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1→4)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1→2)]- $\beta$ -D-fucopyranosyl $\rangle$ -11(12)-oleanen-3,13,23,28-tetrols.

Dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die Gewährung eines Stipendiums. Herrn Prof. Dr. E. Breitmaier sei für die Messungen und Interpretation der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren gedankt. Dem Institut für Pflanzenkrankheiten, Bonn, danken wir für die Ausführung der Mikrobiologischen Tests, Herrn Prof. Dr. H. Flück, Pharmazeutisches Institut der ETH Zürich, vielmals für die Anregung zu dieser Arbeit.

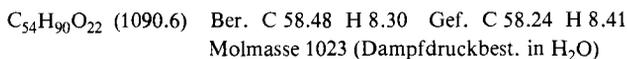
## Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Mikroskopheiztisch nach Kofler-Weygand. – Optische Drehungen: Perkin-Elmer-Polarimeter 141. – IR-Spektren: Perkin-Elmer, Modell 221. – Massenspektren: Gerät MS-50 (A.E.I.). – UV-Spektren: Gerät Cary 18. –  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren: Gerät WH 90 und WP 80 der Fa. Bruker. – Die Molmasse des Saponins (Dampfdruckbestimmung) ermittelte das Mikroanalytische Laboratorium Dr. Pascher, Bonn. – Gaschromatographie: Gerät F-22 der Fa. Perkin-Elmer mit Flammenionisationsdetektor, 2-m-Säulen (OV 101, OV 17) mit Temperaturprogramm (120–160°C, 2°/min),  $\text{N}_2$ -Durchfluß 10 ml/min. – Dünnschichtchromatographie: Kieselgel HF<sub>254</sub>, Aluminiumoxid F<sub>254</sub> (Typ E) und Kieselgel G der Firma Merck, Darmstadt. – Dickschichtchromatographie: Kieselgel PF<sub>254</sub> und Kieselgel PF<sub>254+366</sub> der Fa. Merck, Darmstadt. – Säulenchromatographie: ungesiebtes Kieselgel der Fa. Herrmann, Köln. – Gelchromatographie: Sephadex G-25 und Sephadex LH-20 der Fa. Pharmacia, Uppsala. – Papierchromatographie: Papier No. 1 der Fa. Whatman und Papier 2043 b Mgl der Fa. Schleicher & Schüll.

Folgende Laufmittelsysteme wurden für die Chromatographie verwendet: A: Chloroform/Methanol/Wasser (74:23:3). – B: Chloroform/Aceton (5:1). – C: Chloroform/Methanol/

Wasser (65:30:3). – D: Essigester/Pyridin/Wasser (360:100:115)<sup>6</sup>. – E: n-Butanol/Ethanol/Wasser (2:1:1) und (4:1:5)<sup>7</sup>. – F: Chloroform/Methanol/Wasser (65:20:10) (org. Phase). – G: Benzol/Aceton (5:1). – H: Chloroform/Methanol/Wasser (65:30:10) (org. Phase). – I: Chloroform/Methanol/Wasser (65:45:12). – K: Cyclohexan/Aceton (7:1). – L: Petrolether/Aceton (5:2).

*Isolierung der Saponine:* 15 kg käufliche Blüten von *Verbascum phlomoides* L. (Fa. Pelucit & Co., Elmshorn) wurden 3mal mit je 80 l Methanol bei Raumtemp. extrahiert. Nach Eindampfen bei 40°C i. Vak. fielen 4.9 kg eines Sirups an; portionsweise wurden je 2.5 kg in 4 l Wasser gelöst und die Lösung erschöpfend mit je 1 l n-Butanol extrahiert. Nach Abfiltrieren eines entstandenen Niederschlages und Eindampfen der organischen Phase i. Vak. erhielt man ca. 100 g eines gelben schaumigen Rückstandes, der an 2 kg Kieselgel (Trockensäule) mit 20 l System A in drei Fraktionen aufgetrennt wurde. Fraktion II (ca. 20 g) wurde weiter an einer 1-kg-Säule (Kieselgel, System A) chromatographiert. Die hierbei angereicherte saponin-haltige Fraktion (ca. 5 g) wurde mit 150 ml dest. Methanol aufgenommen und 48 h bei Raumtemp. stehengelassen. Man erhielt 2.1 g kristallines Saponingemisch, das mit einem Flavonoid cokrystallisierte. Nach Umkristallisieren aus Methanol/Wasser (5:1) erhielt man 1.1 g farblose Kristalle des Saponingemisches. 1 g davon wurde an 50 g Sephadex G-25 mit Wasser in zwei Komponenten aufgetrennt. Fraktion A (ca. 800 mg) enthielt fast nur das Hauptsaponin (1); dieses wurde schließlich an 210 g Kieselgel mit System B chromatographiert und rein erhalten: Schmp. 263–268°C.



*Hämolyse*<sup>4</sup>): Der Hämolyse-Test wurde mit frischem Rinderblut durchgeführt, dem 10 Vol.-% 3.65proz. Natriumcitratlösung zugefügt worden waren. 10 mg Verbascosaponin (1) löste man in 50 ml Phosphatpufferlösung (pH 7.4); die Blutkörperchenaufschwemmung bestand aus 2 ml Blut-Citrat-Gemisch, das mit Phosphatpufferlösung auf 100 ml aufgefüllt worden war. Je 1 ml dieser Suspension wurde mit 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 und 0.05 ml Saponinlösung versetzt und mit Phosphatpufferlösung auf 2 ml aufgefüllt; nach 15 min zeigten alle Mischungen vollständige Hämolyse. Dann wurden Saponinlösungen von 40, 30, 25, 20 und 10 µl untersucht; nach 24 h erwies sich eine Konzentration von 30 µl Saponinlösung als noch hämolytisch aktiv.

Der Hämolytische Index wurde mit einem Standard-Saponin (Saponinum Standard Ph. Helv. V. Etalon, No 90477) bestimmt, dessen Hämolytischer Index bekannt war. Für das Standard-Saponin wurde eine Konzentration von 0.35 ml als noch hämolytisch aktiv gefunden.

$$\text{Hämolytischer Index} = S \frac{a}{b} \quad \begin{array}{l} S = \text{Hämolytischer Index des Standards} = 25000 \\ a = \text{Konzentration des Standards} = 0.35 \text{ ml} \\ b = \text{Konzentration des Verbascosaponins} = 0.03 \text{ ml} \end{array}$$

Hämolytischer Index des Verbascosaponins (1): 290000

*Acetylierung des Verbascosaponins:* 20 mg 1 in 1 ml Pyridin wurden mit 2 ml Acetanhydrid 24 h bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Eindampfen der Lösung i. Vak. wurde der Rückstand mit 50 ml Chloroform aufgenommen und die Lösung mit 5 ml 5proz. Salzsäure geschüttelt. Die Chloroformphase wurde danach mit 5 ml 5proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit 10 ml Wasser gewaschen; nach Trocknen über Natriumsulfat wurde die Chloroformphase i. Vak. eingedampft: 27 mg Peracetat, Schmp. 168°C. Im IR-Spektrum ließ sich keine OH-Absorption mehr nachweisen.



*Isolierung und Identifizierung der Aglycone:* 1.0 g Saponingemisch wurde mit 300 ml 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 min unter Rückfluß erhitzt. Dann wurde heiß filtriert. Nach Zugabe von 600 ml Wasser und Abkühlen erhielt man ca. 350 mg hellbraunen Niederschlag. Daraus konnte dick-

schichtchromatographisch im System B 125 mg Aglycon A (2) isoliert werden: Schmp. 310–314 °C (Lit.<sup>2)</sup> 295–299 °C).  $[\alpha]_D^{20} = -74.8^\circ$  ( $c = 1.5$ , in Pyridin) (Lit.<sup>2)</sup>  $-65.4^\circ$ ,  $c = 1.5$ , in Pyridin).

UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 244 (4.46), 252 (4.51), 262 nm (4.36). – <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS<sub>int.</sub>):  $\delta = 6.44$  (dd,  $J = 11$  und 4 Hz, 11-H), 5.79 (dd,  $J = 11$  und 2.2 Hz, 12-H), 0.72, 0.79, 0.89, 0.95, 0.97, 1.25 (s, 6 CH<sub>3</sub>-Gruppen). – <sup>13</sup>C-NMR siehe Tab. 1. – MS (70 eV):  $m/e = 456$  (M<sup>+</sup>, 5%), 425 (M – CH<sub>2</sub>OH, 100), 407 (M – CH<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, 10), 301 (M – C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>, 8), 255 (C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub>, 15), 215 (M – C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub>, 11), 163 (M – C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>, 23), 149 (M – C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>O<sub>3</sub>, 21). Hochauflösung: C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, Ber. 456.3604, Gef. 456.3597.

Daneben wurden noch 37 mg Aglycon B (3) isoliert: Schmp. 265–270 °C (Lit.<sup>2)</sup> 265–270 °C),  $[\alpha]_D^{20} = -91.3^\circ$  ( $c = 0.53$ , in Pyridin) (Lit.<sup>2)</sup>  $-88.3^\circ$ , keine Angabe).

UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 235 (3.98), 243 (4.03), 252 nm (3.88). – <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS<sub>int.</sub>):  $\delta = 5.51$  (1H, Pseudo-Triplett,  $J = 3$  Hz, Vinylproton), 3.3–3.8 (5H, 2mal 2H von CH<sub>2</sub>OH und 1H von CHOH), 2.55 (2H, austauschbar mit D<sub>2</sub>O), 0.79, 0.89, 0.96 und 1.00 (6 CH<sub>3</sub>). – MS (70 eV):  $m/e = 426$  (M<sup>+</sup>), 411 (M – CH<sub>3</sub>), 392, 330, 241, 203, 190, 175, 159, 145. Hochauflösung: C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>, Ber. 426.3490, Gef. 426.3498.

Tab. 1. <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Triterpen A (2) und Verbascogenin. Lösungsmittel (<sup>12</sup>CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO für Verbascogenin und <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>OD/<sup>12</sup>CDCl<sub>3</sub> (1:3) für Triterpen A (Meßfrequenz: 20 MHz)

C-Atom	Kohlenstoffart nach Off-Resonance- Entkopplung	Triterpen A $\delta$ [ppm]	Verbascogenin $\delta$ [ppm]
C-1	–CH <sub>2</sub> –	38.2	37.9
C-2	–CH <sub>2</sub> –	24.4	26.2
C-3	>CH–O–	75.6	83.3
C-4	–C<	42.4	42.7
C-5	–CH<	49.3	46.3
C-6	–CH <sub>2</sub> –	18.6	19.2
C-7	–CH <sub>2</sub> –	32.3	30.4
C-8	–C<	40.0	41.1
C-9	–CH<	54.6	52.8
C-10	–C<	36.8	35.4
C-11	=C<	126.4	130.4
C-12	=CH–	125.8	130.8
C-13		=C< 136.8	–C<O– 84.0
C-14	–C<	40.5	41.0
C-15	–CH <sub>2</sub> –	32.3	34.6
C-16	–CH <sub>2</sub> –	26.3	26.2
C-17	–C<	42.6	43.1
C-18		=C< 135.1	–CH< 33.4
C-19	–CH <sub>2</sub> –	38.5	50.7
C-20	–C<	33.1	31.3
C-21	–CH <sub>2</sub> –	35.3	37.0
C-22	–CH <sub>2</sub> –	29.2	37.0
C-23	–CH <sub>2</sub> –O–	63.6	60.5
C-24	–CH <sub>3</sub>	11.4	11.8
C-25	–CH <sub>3</sub>	18.5	17.7
C-26	–CH <sub>3</sub>	20.6	19.2
C-27	–CH <sub>3</sub>	16.8	16.6
C-28	–CH <sub>2</sub> –O–	70.0	68.8
C-29	–CH <sub>3</sub>	32.5	30.4
C-30	–CH <sub>3</sub>	24.6	23.4

(Die Zuordnung der –CH<sub>2</sub>-Kohlenstoffe wurde nach dem Kriterium der besten Übereinstimmung mit Vergleichsverbindungen nach Lit.<sup>5)</sup> getroffen und ist insofern nicht streng bewiesen.)

*Qualitative Zuckerbestimmung von Verbascosaponin:* 100 mg **1** wurden mit 50 ml 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 h bei 110°C unter Rückfluß erhitzt. Nach Verdünnen mit 150 ml Wasser und Abfiltrieren neutralisierte man das Filtrat mit Bariumcarbonat und dampfte i. Vak. ein. Man erhielt 46 mg Zuckergemisch, das dünn-schicht- und papierchromatographisch in den Systemen A, D und E als L-Rhamnose, D-Glucose und D-Fucose identifiziert wurde.

*Quantitative Zuckerbestimmung von Verbascosaponin*<sup>8,9</sup>): 45 mg des Zuckergemisches wurden 24 h mit 10 ml Wasser äquilibriert. Dann wurde mit Benzol zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit 5 ml 5proz. wasserfreier methanolischer Salzsäure 3 h erhitzt. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit 50 ml Wasser, neutralisierte mit Ionenaustauscher Dowex-3 (OH-Form) und dampfte wiederum mit Benzol zur Trockene ein. Das Glycosidgemisch löste man in 0.8 ml Pyridin und erhitzte 1 h unter Feuchtigkeitsausschluß mit 0.4 ml Hexamethyldisilazan und 0.4 ml Trimethylchlorsilan auf 95°C. Nach dem Abkühlen wurde i. Vak. eingeeengt, mit 10 ml Benzol aufgenommen, filtriert und erneut i. Vak. eingedampft. Das silylierte Glycosidgemisch wurde für die Gaschromatographie in 0.5 ml trockenem Toluol gelöst. Man erhielt folgendes Verhältnis der Monosaccharide: Rhamnose/Glucose/Fucose = 1.0:2.3:0.99 (1:2:1). Je 0.2 mmol Glucose, 0.1 mmol Fucose und 0.1 mmol Rhamnose wurden in gleicher Weise silyliert. Gaschromatographisch ergab sich das Verhältnis der Monosaccharide Rhamnose/Glucose/Fucose zu 1.0:2.24:0.87.

*Permethylierung des Verbascosaponins*<sup>10</sup>): 500 mg **1** wurden in 80 ml wasserfreiem DMSO mit 500 mg NaH 3 h bei Raumtemp. unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt; dann setzte man 3 ml Methyljodid zu und rührte unter Lichtschutz. Danach gab man 4mal (alle 12 h) 200 mg NaH und 3 ml Methyljodid zu, goß dann die Reaktionsmischung in 200 ml Wasser und extrahierte 4mal mit je 200 ml Chloroform. Die vereinigten Chloroformphasen wurden einmal mit 50 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Die Substanz (800 mg) wurde an 100 g Kieselgel mit Chloroform/Aceton (30:1 bis 5:1) von Nebenprodukten befreit und rein erhalten. Das IR-Spektrum zeigte keine OH-Absorption mehr.

*Totalhydrolyse des permethylierten Verbascosaponins:* Die Lösung von 400 mg permethyliertem Saponin in 40 ml 5proz. methanolischer Salzsäure wurde 2 h unter Rückfluß auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit Wasser auf das doppelte Volumen, filtrierte den Niederschlag ab und dampfte das Filtrat i. Vak. ein. Der Rückstand wurde mit 30 ml 2 N HCl noch einmal 2 h erhitzt. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit 100 ml Wasser, neutralisierte mit Ionenaustauscher Dowex-3 (OH-Form) und engte i. Vak. ein. Das Methylzuckergemisch (158 mg) wurde über eine 25-g-Kieselgelsäule mit System F aufgetrennt: 18 mg 2,3,4,-Tri-O-methyl-L-rhamnose (Z-I), 23 mg 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose (Z-II), 36 mg Z-I und Z-II, 28 mg 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucose und 25 mg 3-O-Methyl-D-fucose. Durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel im System G wurden Z-I (12 mg) und Z-II (14 mg) getrennt. Die Identifizierung der Zucker wurde nach den üblichen Methoden durchgeführt<sup>1,13,14</sup>.

*Partialhydrolyse des Verbascosaponins:* Die Lösung von 20 mg **1** in 10 ml Ethanol wurde mit 10 ml 0.5 N HCl bei 90–100°C unter Rückfluß erhitzt, bis kein Ausgangsprodukt mehr vorhanden war (2 h 15 min); die Hydrolyse kontrollierte man dünn-schichtchromatographisch mit dem System H. Der Ansatz wurde zur Trockene gebracht, der Rückstand in 20 ml Wasser suspendiert und die Suspension 4mal mit je 10 ml n-Butanol extrahiert. Durch Papierchromatographie mit System D und durch Dünn-schichtchromatographie mit System I konnte aus der wäbr. Phase L-Rhamnose im Vergleich mit authentischem Material nachgewiesen werden.

Die vereinigten n-Butanol-Extrakte (12 mg) wurden säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem System A vorgetrennt; es fielen 8 mg angereichertes Partialglycosid an, das ohne nochmalige Reinigung weiter umgesetzt wurde.

**Permethylierung des Partialglycosids<sup>10</sup>:** 8 mg vorgereinigtes Partialglycosid (Desrhamnodosydratosaponin) wurden in 2 ml wasserfreiem DMSO gelöst und wie oben permethyliert. Zur Reinigung des permethylierten Partialglycosids chromatographierte man an Kieselgel mit dem System K und erhielt 4.2 mg vorgetrenntes Produkt, das über eine DC-Folie F 1500 LS 254 (Schleicher & Schüll) mit dem System L getrennt und rein erhalten wurde (2 mg).

**Totalhydrolyse des permethylierten Partialglycosids:** Die Lösung von 2 mg permethyliertem Partialglycosid in 1 ml 5proz. wasserfreier methanolischer HCl wurde 2 h bei 70 °C unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit 5 ml Wasser, filtrierte von dem ausgefallenen Niederschlag ab, rotierte das Filtrat zur Trockne ein und hydrolysierte die Methylzucker 2 h mit 1 ml 2 N HCl bei 110 °C unter Rückfluß nach. Nach dem Abkühlen wurde mit Wasser auf 20 ml verdünnt und mit Ionenaustauscher Dowex-3 (OH-Form) neutralisiert. Dünnschichtchromatographisch (Systeme F und G) konnten im Vergleich mit authentischen Substanzen nur 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose und 3-O-Methyl-D-fucose nachgewiesen werden.

**Enzymatische Spaltung des Verbascosaponins:** Jeweils 2 mg **1** wurden in 2 ml Wasser mit den folgenden Enzymen unter Rühren bei 39 °C inkubiert: a) Mischenzym EL 27 – 67 der Fa. Röhm & Haas, Darmstadt ( $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Galactosidase und  $\alpha$ -Rhamnosidase); b)  $\beta$ -Glucosidase purum der Fa. Roth; c) Suc d'Hélix Pomatia der Fa. Industrie Biologique Française, Gennevilliers, d)  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus ventii*; e) Emulsin. Auch nach 10 Tagen zeigte sich keine Veränderung des Ausgangsproduktes. Analoge Versuche mit den Enzymen a) und b) in 2 ml Citratpuffer (pH 4) der Fa. Merck führten zu dem gleichen negativen Ergebnis.

Die **Mikrobiologische Wirksamkeit** von Verbascosaponin (**1**) wurde im Plattendiffusionstest (50  $\mu$ g/ml; 24 h) gegen folgende Mikroorganismen getestet:

Mikroorganismus	Hemmhof $\varnothing$ mm	Mycel Wachstum Kontrolle = 31
<i>Bacillus mycoides</i>	8.5	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–	–
<i>Escherichia coli</i>	15.0	–
<i>Trichoderma viride</i>	–	14
<i>Pythium debaryanum</i>	–	–

## Literatur

- 1) XXXII. Mitteil.: R. Tschesche und W. Wiemann, Chem. Ber. **110**, 2407 (1977).
- 2) J. L. Breton und A. G. Gonzáles, J. Chem. Soc. **1963**, 1401.
- 3) L. Ramachandra Row, P. Swyanayana Murty und M. A. Jairay, Indian J. Chem. **9**, 385 (1971).
- 4) J. Büchi, F. Hippenmeyer und R. Dolder, Pharm. Acta Helv. **5**, 143 (1950).
- 5) K. Tori, S. Seo, Y. Yoshimura, M. Nakamura, Y. Tomita und H. Ischii, Tetrahedron **46**, 4167 (1976).
- 6) P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirota, G. Ruffini und A. Sartori, J. Chromatogr. **3**, 345 (1960).
- 7) J. M. Choy und G. G. A. Dutton, Can. J. Chem. **51** (2), 198 (1973).
- 8) G. Wulff, J. Chromatogr. **18**, 2856 (1965).
- 9) T. M. Braun, Diplomarbeit, Univ. Bonn 1975.
- 10) S. Hakomori, J. Biochem. (Tokyo) **55**, 205 (1964).
- 11) E. Breitmaier und G. Bauer, <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie – Eine Arbeitsanleitung mit Übungen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977.
- 12) P. A. J. Gorin und M. Mazurek, Can. J. Chem. **53**, 1212 (1975).
- 13) R. Tschesche, M. Tauscher, H. W. Fehlhaber und G. Wulff, Chem. Ber. **102**, 2072 (1969).
- 14) F. Reber und T. Reichstein, Helv. Chim. Acta **29** (2), 343 (1946).