

Rudolf Tschesche, Lothar Seidel, Satish Chandra Sharma und Günter Wulff

Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette, VI¹⁾

Über Lanatigosid und Lanagitosid, zwei bisdesmosidische 22-Hydroxy-furostanol-Glykoside aus den Blättern von *Digitalis lanata* Ehrh.

Aus dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 22. Juni 1972)



Aus den Blättern des wolligen Fingerhuts (*Digitalis lanata*) wurden zwei bisdesmosidische Furostanolglykoside, Lanatigosid (**2a**) und Lanagitosid (**2b**), isoliert. Das Vorliegen eines 22-Hydroxy-furostanol-Derivats wurde durch Isolierung von Dihydro-tigogenin bzw. Dihydro-gitogenin nach Hydrierung und saurer Hydrolyse bewiesen. Durch enzymatische Spaltung gingen **2a** und **2b** unter Abspaltung von 2 Moll. D-Glucose und Cyclisierung der Seitenkette in die Spirostanolsaponine Desgluco-lanatigonin II (**1a**) und Gitonin (**1b**) über. Die Struktur der Zuckerkette am 3-OH wurde durch Permethylierung, Spaltung und Identifizierung der gebildeten Methylzucker aus **2a**, **2b**, **1a**, **1b**, sowie durch Partialhydrolyse ermittelt. Demnach besitzen **2a** und **2b** am 3-OH die gleiche Zuckerkette wie Digitonin. Ein Mol D-Glucose findet sich als β -Glucosid an der OH-Gruppe am C-26 des Furostanols.

Steroid Saponins with More than One Sugar Chain, VI¹⁾

Lanatigoside and Lanagitoside, Two Bisdesmosidic 22-Hydroxyfurostanol Glycosides from the Leaves of *Digitalis lanata* Ehrh.

From the leaves of the woolly foxglove (*Digitalis lanata*) two bisdesmosidic furostanol glycosides, lanatigoside (**2a**) and lanagitoside (**2b**), were isolated. The presence of a derivative of a 22-hydroxyfurostanol was proved by the isolation of dihydrotigogenin and dihydrogitogenin, respectively, after hydrogenation and acid hydrolysis. By enzymatic fission **2a** and **2b** lose two molecules of D-glucose and by cyclization of the side chain the spirostanol saponins desgluco-lanatigonin II (**1a**) and gitonin (**1b**), respectively, were formed. The structure of the sugar chain at 3-OH was elucidated by permethylation, fission and identification of the methyl sugars obtained from **2a**, **2b**, **1a**, **1b** and from partial hydrolysis products. Therefore **2a** and **2b** have the same sugar chain at 3-OH as digitonin. One additional molecule of D-glucose as a β -glucoside is attached to the OH-group at C-26 of the furostanol system.



Nachdem 1967 erstmalig der Nachweis gelang, daß die neutralen Steroidsaponine in der Pflanze vielfach als bisdesmosidische 22-Hydroxy-furostanol-Glykoside vorliegen²⁾, konnten in der Folgezeit neben dem Sarsaparillosid aus *Radix sarsaparillae*²⁾

¹⁾ V. Mitteil.: *R. Tschesche und P. Lauven*, Chem. Ber. **104**, 3549 (1971).

²⁾ *R. Tschesche, G. Lüdke und G. Wulff*, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 2785; *Chem. Ber.* **102**, 1253 (1969).

auch solche aus *Convallaria majalis*³⁾, aus *Dioscorea*-Arten⁴⁾ und aus *Smilax aspera*⁵⁾ isoliert und in der Struktur zum Teil geklärt werden. Auch *Avena sativa* enthält sehr ähnliche bisdesmosidische Furano-furostanolsaponine^{1,6)}.

Die Blätter von *Digitalis lanata* Ehrh. enthalten ein Saponingemisch, aus dem schon 1935 ein als Tigonin benanntes Saponin isoliert werden konnte, das Tigogenin, Glucose, Galaktose und Xylose enthielt⁷⁾. Nachdem bereits früher die Zugehörigkeit der Hauptsaponine zu den bisdesmosidischen 22-Hydroxy-furostanol-saponinen wahrscheinlich gemacht werden konnte²⁾, berichten wir jetzt über die vollständige Strukturaufklärung der beiden Hauptsaponine, Lanatigosid (**2a**) und Lanagitosid (**2b**).

Für die Untersuchungen wurden die Blätter nach vorherigem Zerkleinern mit 80-proz. Methanol extrahiert und durch Ausschütteln mit Tetrachlorkohlenstoff das Chlorophyll entfernt. Der Extrakt wurde weiter mit Chloroform und Essigester ausgeschüttelt und anschließend die wäßrige Phase zur Gewinnung der Saponine mit n-Butanol erschöpfend extrahiert.

Eine Auftrennung des Rohsaponins in zwei gut wasserlösliche Hauptsubstanzen gelang durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser als Laufmittel. Diese bestanden jedoch, wie allgemein bei Furostanolsaponinen²⁾, jeweils aus einer Mischung von 22-Hydroxy- (**2a**, **2b**) und 22-Methoxy-furostanol-saponin (**3a**, **3b**). Das in methanolhaltigem Lösungsmittel sich einstellende Gleichgewicht der beiden Derivate ließ sich mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie²⁾ an Kieselgel nachweisen. Es gelang nicht, die beiden 22-Hydroxy-Verbindungen **2a** und **2b** völlig frei von den Methoxy-Derivaten **3a** und **3b** zu erhalten, so daß mit Mischungen von **2a**, **3a** und **2b**, **3b** für die Strukturermittlung gearbeitet werden mußte.

Bei der sauren Hydrolyse erhielt man aus **2a**, **3a** Tigogenin und aus **2b**, **3b** Gitogenin als Aglykon, dabei liegen **2a**, **3a** und **2b**, **3b** etwa im Verhältnis 1:2 vor.

Daß Tigogenin und Gitogenin nicht die wahren Genine dieser Glykoside sind, zeigte das IR-Spektrum von **2a**, **3a** und **2b**, **3b** in dem die typischen Spirostanol-Banden bei 845, 892 und 912/cm fehlen.

Zum Nachweis der Furostanolstruktur mit Zuckerketten am 3-OH und am 26-OH des Aglykons hydrierte man **2a**, **3a** und **2b**, **3b** bei Raumtemperatur in Methanol mit Platin(IV)-oxid als Katalysator. Unter diesen Reaktionsbedingungen wird nur die 22-Hemiketalgruppierung hydriert³⁾. Durch saure Hydrolyse und anschließende Säulenchromatographie an Kieselgel erhielt man die gegenüber den Spirostanolen polaren Aglykonederivate Dihydro-tigogenin und Dihydro-gitogenin in kristalliner Form. Durch Vergleich mit authentischem Material konnten die beiden Dihydrogenine identifiziert werden. Ein Spirostanolsaponin wäre unter den genannten Bedingungen nicht hydriert worden und hätte bei der sauren Hydrolyse Tigogenin und Gitogenin ergeben.

³⁾ R. Tschesche, B. T. Tjoa, G. Wulff und R. V. Noronha, Tetrahedron Letters [London] 1968, 5141.

⁴⁾ S. Kiyosawa, M. Hutoh, T. Komori, T. Nohara, I. Hosokawa und T. Kawasaki, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] 16, 1162 (1968).

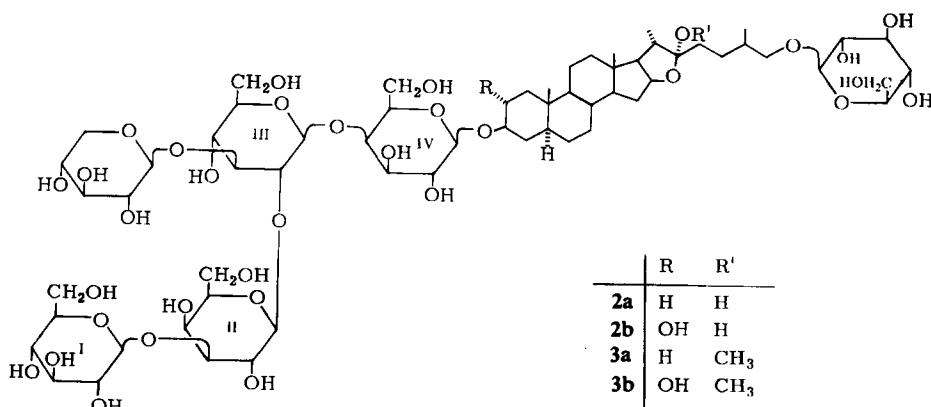
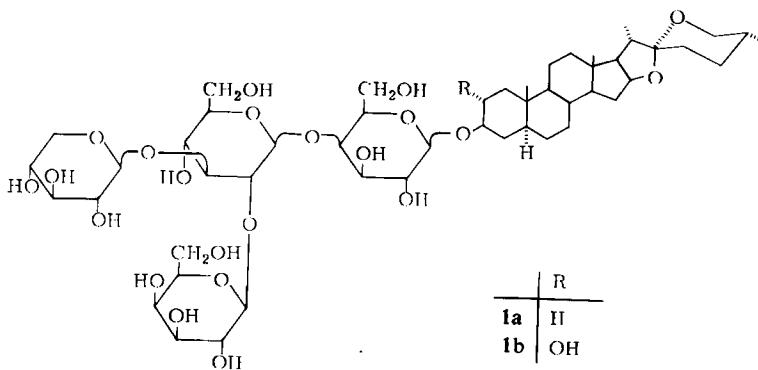
⁵⁾ J. Petričić und A. Radosević, Farmac. Glasnik 25, 91 (1969), C. A. 71, 64049w (1969).

⁶⁾ R. Tschesche, M. Tauscher, H.-W. Fehlhaber und G. Wulff, Chem. Ber. 102, 2072 (1969).

⁷⁾ R. Tschesche, Ber. dtsch. chem. Ges. 68, 1090 (1935).

Einen weiteren Beweis der 22-Hemiketalgruppierung von **2a** und **2b** liefert die Reduktion mit NaBH_4 in wässriger Lösung²⁾. Das nach saurer Hydrolyse aufgetrennte „Aglykongemisch“ ergab verschiedene polare Verbindungen, darunter Dihydro-tigogenin und Dihydro-gitogenin. Außerdem entstanden aufgrund unvollständiger Reduktion auch etwas Tigogenin und Gitogenin.

Bei der enzymatischen Hydrolyse mit einer β -Glucosidase aus *Aspergillus wentii* wird bevorzugt die β -D-Glucose der Seitenkette abgespalten, die dabei entstehende Verbindung stabilisiert sich sofort zum Spiroketal-Derivat. Gleichzeitig wird noch eine endständige Glucose von der Zuckerkette am OH an C-3 abgelöst. Die gebildeten Spirostanol-Derivate Desgluco-lanatigonin II (**1a**) und Gitonin (**1b**) wurden nach Säulenchromatographie in kristalliner Form erhalten. Die saure Hydrolyse lieferte Tigogenin und Gitogenin, wie durch Vergleich mit authentischen Proben sichergestellt werden konnte. Die quantitative Zuckerbestimmung nach saurer Methanolysen durch Gaschromatographie der persilylierten Methylglykoside⁸⁾ zeigte in beiden Glykosiden Glucose, Galaktose und Xylose im Verhältnis 1 : 2 : 1 an.



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

Zusammensetzung der Zuckerkette

Um Einblick in die Zuckerverknüpfung von Lanatigosid (**2a**) und Lanagitosid (**2b**) zu erhalten, wurden zunächst **1a** und **1b** nach *Hakomori*⁹⁾ permethyliert und die Permethylderivate sauer hydrolysiert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man in beiden Fällen die Methylzucker 2.3.4-Tri-*O*-methyl-*D*-xylose, 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-*D*-galaktose, 2.3.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose und 4.6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose. Die Methylzucker wurden, außer der 2.3.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose, kristallin (die Tetramethylgalaktose als Anilid) erhalten und durch Vergleich mit authentischen Präparaten identifiziert. Das Auftreten der 4.6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose zeigt eine Verzweigung der Kette an, dementsprechend werden zwei endständige Permethylducker gefunden.

Zur weiteren Klärung der Zuckerverknüpfung unterwarf man **1a** und **1b** der partiellen Säurehydrolyse¹⁰⁾ in Dioxan/0.1 *n* HCl (1:1). Da Vorversuche für **1a** und **1b** eine gleichartige Zuckerverknüpfung gezeigt hatten, wurde die präparative Isolierung der Reaktionsprodukte aus Ansätzen mit dem Gemisch von **1a** und **1b** durchgeführt. Durch übliche Aufarbeitung erhielt man zuckerärmer Glykoside und neben Monosacchariden ein Disaccharid. Die Trennung an Kieselgel ergab neben *D*-Xylose, *D*-Glucose und *D*-Galaktose vor allem β -*D*-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- α -*D*-galaktopyranose (Lycobiose)^{10,11)}. Sie konnte mit authent. Material eindeutig identifiziert werden. Das Auftreten der Lycobiose beweist unabhängig von der Methylierung, daß die Glucose mit der geninständigen Galaktose (siehe folgenden Absatz) (1 \rightarrow 4)-verknüpft ist.

Aus dem Gemisch der zuckerärmeren Glykoside konnten jeweils zwei Verbindungen isoliert werden. Die weniger polaren ergaben bei saurer Hydrolyse *D*-Galaktose und die Methylierung lieferte 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-*D*-galaktose, d. h. es handelt sich um eine Mischung der Monoglykoside des Tigogenins und Gitogenins, die *D*-Galaktose muß direkt mit dem Aglykon an C-3 verknüpft sein.

Bei den polareren Komponenten ließen sich nach der sauren Hydrolyse *D*-Glucose und *D*-Galaktose nachweisen, die Methylierung ergab 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-*D*-galaktose, 2.3.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose und 3.4.6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose, letztere konnte durch Vergleich mit synthetischer 3.4.6-Tri-*O*-methyl-*D*-glucose identifiziert werden. Das zeigt, daß es sich um die xyloseärmeren Glykoside von **1a** und **1b** handelt und daß die *D*-Xylose mit dem 3-ständigen Hydroxyl und die *D*-Galaktose II mit der OH-Gruppe an C-2 des *D*-Glucoserestes III verknüpft ist.

Zur vollständigen Klärung der Zuckerkette wurden **2a** und **2b** im Gemisch nach *Hakomori*⁹⁾ permethyliert und anschließend sauer hydrolysiert. Die Auf trennung der Methylzucker erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel¹²⁾, es waren 2.3.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose, 4.6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose und 2.3.4-Tri-*O*-methyl-*D*-xylose wie aus **1a** und **1b** entstanden. An Stelle von 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-*D*-galaktose

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

10) *R. Tschesche* und *G. Wulff*, *Tetrahedron [London]* **19**, 621 (1963).

11) *R. Kuhn* und *I. Löw*, *Chem. Ber.* **86**, 1027 (1953).

12) *R. Tschesche* und *G. Ballé*, *Tetrahedron [London]* **19**, 2323 (1963).

erhielt man aber 2.4.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose und 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose. Die im Molverhältnis von etwa 1:1:1:1:2 erhaltenen Methylzucker kristallisierten bis auf die 2.3.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose und konnten durch Vergleich mit authentischen Verbindungen identifiziert werden.

Das Auftreten von 2 Moll. 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose beweist, daß 2 Moll. *D*-Glucose endständig gebunden sind. Gegenüber **1a** und **1b** ändert sich an der Kette an C-3 nur, daß zusätzlich ein Molekül Tetramethyl-*D*-glucose gebildet worden ist und diese mit Galaktose II glykosidisch (1→3)-verknüpft ist. Das zweite Molekül *D*-Glucose in **2a** und **2b** kann daher nicht an der Zuckerkette an C-3 des Aglykons angreifen, da sonst andere Methylzucker hätten auftreten müssen. Sie muß daher über die 26-OH-Gruppe an das Furostanolgerüst gebunden sein.

Auf Grund der beschriebenen Untersuchungen ergibt sich für Lanatigosid (**2a**) und Lanagitosid (**2b**) folgende Struktur: 3-*O*-{[β -*D*-Glucopyranosyl(I)-(1→3)_{Galakt. II}]- β -*D*-galaktopyranosyl(II)-(1→2)_{Gluc. III}}- β -*D*-xylopyranosyl-(1→3)_{Gluc. III}- β -*D*-glucopyranosyl(III)-(1→4)_{Galakt. IV}]- β -*D*-galaktopyranosyl(IV)}-26-*O*-{ β -*D*-glucopyranosyl}- $(25R)$ -5 α -furostan-3 β .22 α .26-triol (**2a**) und 3-*O*-{[β -*D*-Glucopyranosyl(I)-(1→3)_{Galakt. II}]- β -*D*-galaktopyranosyl(II)-(1→2)_{Gluc. III}}- β -*D*-xylopyranosyl-(1→3)_{Gluc. III}- β -*D*-glucopyranosyl(III)-(1→4)_{Galakt. IV}]- β -*D*-galaktopyranosyl(IV)}-26-*O*-{ β -*D*-glucopyranosyl}- $(25R)$ -5 α -furostan-2 α .3 β .22 α .26-tetraol (**2b**).

Die Formulierung mit β -glykosidischer Bindung der beiden endständigen *D*-Glucosen ergibt sich durch die Spaltbarkeit mit β -Glucosidase, die der Glucose III durch die Isolierung von Lycobiose. Die Konfiguration der übrigen Glykosidbindungen wurde nicht direkt bewiesen und stützt sich auf Analogieschlüsse.

Während für das Lanatigosid nur eine OH-Gruppe für die Bindung der komplexeren Zuckerkette mit dem Aglykon zur Verfügung steht, liegt im Lanagitosid die Möglichkeit einer Verknüpfung über die OH-Gruppen an C-2 und C-3 vor. Wegen der großen Ähnlichkeit in den Eigenschaften beider Verbindungen wurde auch für Lanagitosid eine Verknüpfung über das 3-OH des Aglykons angenommen.

Bemerkenswert ist, daß die hier gefundene Zuckerkette am 3-OH die gleiche Verknüpfung besitzt wie Digitonin¹⁰⁾ aus den Samen von *Digitalis purpurea* L. Sie unterscheidet sich jedoch von dem aus den Samen von *Dig. lanata* isolierten Hauptsapponin, Lanatigonin I¹²⁾, in der Verknüpfung von Glucose III mit der Galaktose IV, die (1→3)-verknüpft sind. Das in geringerer Menge in den Samen vorliegende Lanatigonin II enthält jedoch wiederum die gleiche Zuckerkette am 3-OH wie Lanatigosid. Das ist insofern bemerkenswert, als nicht nur durch Abspaltung der *D*-Glucose vom 26-OH und Cyclisierung ein Übergang von Blatt- in Samensaponine stattfindet, sondern zum Teil ein Umbau der Zuckerkette auftreten muß. Ähnliche Verhältnisse liegen offensichtlich auch bei *Dig. purpurea* vor, da F-Gittonin aus den Blättern eine andere Zuckerstruktur als das Gittonin der Samen besitzt. Unsere Untersuchungen zeigen gleichzeitig, daß die für Gittonin aus den Samen von *Dig. purpurea* vorgeschlagene Formel korrekt ist, da **1b** sich bei direktem Vergleich als Gittonin erwies.

Die hier beschriebenen Furostanolsaponine zeigen wie die bisher untersuchten keine hämolytische Aktivität, während die zugehörigen Spirostanolderivate stark hämolytisch wirksam sind (Tab. 1).

Hämolytische Wirksamkeit der isolierten Saponine

Lanatigosid	> 250 µg/ccm	Desgluco-lanatigonin II	0.6 µg/ccm
Lanagitoxid	> 250 µg/ccm	Gitonin	2.0 µg/ccm

Dem *Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen* danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, der *Alexander von Humboldt-Stiftung* für die Gewährung eines Stipendiums (für S. C. Sharma), Herrn Prof. Dr. G. Legler für die Überlassung von Enzympräparaten und Herrn Priv.-Doz. Dr. E. Schlosser für die Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit. Der Fa. *P. Beiersdorf & Co. AG*, Hamburg, sind wir für die Überlassung der *Digitalis lanata*-Extrakte sehr zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch nach Kofler-Weygand, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Die IR-Spektren wurden mit dem Spektrophotometer Perkin-Elmer, Modell 221, mit Gitter-Prismen-Austauscheinheit, aufgenommen. Die C, H- und N-Analysen sind im Mikroanalytischen Laboratorium Dr. F. Pascher, Bonn, angefertigt worden.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) an Kieselgel G (Merck) führte man wie üblich aus¹³⁾. Es wurde mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1 : 2) oder mit Anilinphthalat in Isobutanol¹⁴⁾ angesprührt. Zur Papierchromatographie (PC) diente das Papier 2043b von Schleicher & Schüll. Die Chromatogramme wurden absteigend entwickelt. Zur Säulenchromatographie benutzte man Kieselgel von der Fa. Gebr. Herrmann, Köln.

Folgende Fließmittelsysteme wurden für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie angewendet: A: Chloroform/Methanol/Wasser (65 : 25 : 10)¹⁵⁾, B: Chloroform/Methanol/Wasser (65 : 30 : 10), C: Benzol/Aceton (10 : 3), D: Benzol/Aceton (10 : 1).

Fließmittelsysteme für die Papierchromatographie: E: Essigester/Pyridin/Wasser (3.6 : 1 : 1.15)¹⁶⁾, F: n-Butanol/Butanon, gesättigt mit Boratpuffer vom pH 8.94 (1 : 1)¹⁷⁾, G: Butanon, gesättigt mit Ammoniak aqu. (2proz.)¹⁸⁾, H: Benzol/Äthanol/Wasser/Ammoniak (200 : 47 : 14 : 1)¹⁹⁾.

Zur Gaschromatographie benutzte man das Gerät F 7/HF von Perkin-Elmer mit Integrator D 2 und Kienzle Digital-Drucker. Als Detektor diente eine Wärmeleitfähigkeitszelle, Trägergas war Helium bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 25–30 cm/Min. Einspritzblock und Detektor wurden auf 250°, der Säulenofen auf 170° geheizt.

Die enzymatischen Spaltungen wurden mit einer β-Glucosidase aus *Aspergillus wentii* durchgeführt²⁰⁾.

Isolierung der Saponine: 6 l des wäbr. Extraktes²¹⁾ aus den Blättern von *Digitalis lanata* Ehrh. wurden 5 mal mit je 2 l n-Butanol extrahiert. Die Butanolphasen wurden mit 2 l Wasser gewaschen und ergaben nach dem Eindampfen i. Vak. bei 40° (Badtemperatur) 225 g Roh-

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

14) S. M. Partridge, Nature [London] **164**, 443 (1949).

15) T. Kawasaki und K. Miyahara, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **11**, 1546 (1963).

16) P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirotta, G. Ruffini und A. Sartori, J. Chromatogr. [Amsterdam] **3**, 343 (1960).

17) M. T. Krauss, H. Jäger, O. Schindler und T. Reichstein, J. Chromatogr. [Amsterdam] **3**, 63 (1960).

18) S. C. Williams und J. K. N. Jones, Canad. J. Chem. **45**, 275 (1966).

19) H. C. Srivastava und G. Adams, Canad. J. Chem. **40**, 1415 (1962).

20) G. Legler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 1359 (1967).

21) Die Extraktion der Blätter mit 80proz. Methanol, das Einengen der Lösung und Ausschütteln mit CCl_4 , Chloroform und Essigester wurde dankenswerterweise von der Fa. *P. Beiersdorf & Co. AG*, Hamburg, übernommen.

saponin-Gemisch. Zur Vorreinigung wurden je 10 g auf 50 g Kieselgel aufgezogen und über eine 100-g-Kieselgelsäule geschickt (Elutionsmittel System A). Man erhielt jeweils etwa 6.8 g Saponingemisch, das auf ca. 50 g Adsorbens aufgezogen an einer 1.2-kg-Kieselgelsäule mit dem Laufmittelsystem B getrennt wurde. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man 1.4 g **2a**, **3a** vom Schmp. 260–283°, $[\alpha]_D^{25} = -18.6^\circ$ ($c = 0.74$, Chloroform/Methanol 1:1) und 2.7 g **2b**, **3b** vom Schmp. 268–292°, $[\alpha]_D^{25} = -28.4^\circ$ ($c = 0.73$, Chloroform/Methanol 1:1).

IR (in KBr): Die IR-Spektren beider Mischungen sind praktisch identisch. Es fehlen die für Spiroketal charakteristischen Absorptionen^{22,23)}, die sich bei Spirostanolsaponinen, in KBr gemessen, sonst gut erkennen lassen²²⁾. In dem entsprechenden Bereich findet sich lediglich eine schwache, verbreiterte Bande bei 900/cm.

Hydrierungen: 600 mg **2a**, **3a** und **2b**, **3b** wurden in Methanol mit 300 mg Adams-Katalysator (Pt^{IV}-Oxid, Degussa-Hanau, 83.77% Pt) 20 Stdn. bei Raumtemperatur unter starkem Rühren und einem H₂-Druck von ca. 40 Torr hydriert. Da die Substanz z. T. ausfiel, wurde vom Platinoxid abfiltriert und mit viel Methanol gewaschen. Nach dem Einengen auf etwa 60 ccm gab man 10 ccm Wasser zu und hydrierte unter den oben beschriebenen Bedingungen 40 Stdn. weiter, anschließend wurde die anorganische Substanz abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingeengt (540 mg). 500 mg wurden 4 Stdn. mit 15 ccm 3 n HCl (6 n HCl/Äthanol 1:1) und 10 ccm Benzol bei 85° Badtemperatur hydrolysiert. Die Benzolphase wurde abgetrennt, mit Wasser gewaschen und eingeengt; die wäßrige Phase extrahierte man mehrmals mit Chloroform und engte die Chloroformphase, nachdem man säurefrei gewaschen hatte, ebenfalls ein. Die vereinigten Rohgenine wurden an Kieselgel mit Benzol/Methanol (10:1) getrennt. Nach Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther erhielt man 40 mg Dihydro-tigogenin vom Schmp. 168.5–170° und 75 mg Dihydro-gitogenin vom Schmp. 188.5–190.5°, identisch mit aus Tigogenin und Gitogenin gewonnenen Präparaten. Dihydro-tigogenin und Dihydro-gitogenin wurden als Vergleichssubstanzen nach der in 1. c.²⁴⁾ beschriebenen Methode gewonnen.

NaBH₄-Reduktion der Saponine: 2 g **2a**, **3a** und **2b**, **3b** (im Gemisch) in 250 ccm Wasser wurden mit 0.8 g NaBH₄ versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend brachte man die Lösung mit konz. Salzsäure auf 3 n an HCl und erhitzte nach Zugabe von 200 ccm Benzol 6 Stdn. unter Rückfluß. Die Benzolschicht wurde abgetrennt, die wäßr. Phase eingeengt (450 mg). Nach Trennung des Gemisches an Kieselgel erhielt man in reiner Form 28 mg Tigogenin, 13 mg Dihydro-tigogenin, 52 mg Gitogenin und 25 mg Dihydro-gitogenin, wie durch Vergleich mit authent. Material nachgewiesen werden konnte. Daneben traten eine ganze Reihe weiterer, schwer trennbarer und recht polarer Substanzen auf.

Methylierung von **2a, **3a** und **2b**, **3b**:** 4 g Eurostanolsaponin (Mischung) wurden unter Rühren in 100 ccm Dimethylsulfoxid mit 2 g Natriumhydrid in kleinen Portionen versetzt und nach 2 Stdn. 5 ccm Methyljodid zugetropft. Alle 12 Stdn. erfolgte erneute Zugabe von ca. 1 g Natriumhydrid und 3 ccm Methyljodid. Nach 3 Tagen wurde vorsichtig in 1 l Wasser gegossen und die Mischung mehrere Stunden gerührt. Danach wurde der Niederschlag abfiltriert und in Chloroform gelöst. Die wäßr. Phase extrahierte man noch 5 mal mit je 100 ccm Chloroform. Die vereinigten Chloroformphasen wusch man anschließend mehrere Male mit Wasser zur Entfernung des Dimethylsulfoxids. Die organische Phase wurde getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach Reinigung der permethylierten Derivate an Kieselgel mit System C als mobiler Phase erhielt man 3 g Substanz.

²²⁾ R. Tschesche, G. Wulff und G. Ballé, *Tetrahedron* [London] **18**, 959 (1962).

²³⁾ M. E. Wall, C. R. Eddy, M. L. McClellan und M. E. Klumpp, *Analytic. Chem.* **24**, 1337 (1952).

²⁴⁾ I. Scheer, R. B. Kostic und E. Mosettig, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 4871 (1953), und **77**, 641 (1955).

Hydrolyse des permethylierten Lanatigosids und Lanagitiosids: Zur Hydrolyse erhitzte man unter Rückfluß 6 Stdn. in 100 ccm 5proz. methanol. Salzsäure. Nach Zusatz des gleichen Vol. Wasser und Abdestillieren des Methanols saugte man das ausgefallene Aglykongemisch ab. Die währ. Lösung wurde stark eingeengt, mit 20 ccm 2 n HCl versetzt und 5 Stdn. auf 100° erhitzt, um die Methylglykoside zu spalten. Anschließend wurde mit Dowex 3 neutralisiert und zur Trockne eingeengt. Das resultierende Zuckergemisch wurde an 150 g Kieselgel mit Benzol/Aceton-Gemischen steigender Polarität (7 : 1, 6.5 : 1, 4 : 1, 3 : 1, 1 : 1) chromatographiert. So erhielt man 62 mg 2.3.4-Tri-*O*-methyl-*D*-xylose, 147 mg 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose, 62 mg 2.3.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose, 60 mg 2.4.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose und 44 mg 4.6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose. Die Identifizierung der Zucker geschah folgendermaßen:

2.3.4-Tri-*O*-methyl-*D*-xylose: Schmp. 89—91° (aus Äther/Petroläther), $[\alpha]_D^{25}$: +37° → +18.3° ($c = 0.5$, Wasser). Die Verbindung war nach Mischprobe und chromatographischem Verhalten (in den Systemen F, G, H) identisch mit authent. Material.

$C_8H_{16}O_5$ (192.2) Ber. C 49.99 H 8.39 Gef. C 49.70 H 8.45

2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-*D*-glucose: Schmp. 90—92° (aus Petroläther), $[\alpha]_D^{25}$: +93° → +80.5° ($c = 1.06$, Wasser). Die Substanz erwies sich nach Misch-Schmp. und chromatographischem Verhalten (in den Systemen F, G, H) als identisch mit authent. Material.

$C_{10}H_{20}O_6$ (236.3) Ber. C 50.83 H 8.53 Gef. C 50.64 H 8.58

2.4.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose: Schmp. 106—108° (aus Benzol/Petroläther), $[\alpha]_D^{25}$: +104° → +85° ($c = 0.5$, Wasser). Die Verbindung erwies sich als identisch mit aus Lanatigonin I isolierter 2.4.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose.

$C_9H_{18}O_6$ (222.2) Ber. C 48.64 H 8.16 Gef. C 48.11 H 8.14

4.6-Di-*O*-methyl-*D*-glucose: Schmp. 159—162° (aus Essigester), $[\alpha]_D^{25}$: +104° → +64° ($c = 0.5$, Wasser). Die Verbindung war nach Mischprobe und chromatographischem Verhalten (in den Systemen F, G, H) identisch mit authent. Material.

$C_8H_{16}O_6$ (208.2) Ber. C 46.15 H 7.75 Gef. C 46.08 H 7.77

2.3.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose: $[\alpha]_D^{25}$: +80° ($c = 0.5$, Wasser). Die nach der Chromatographie erhaltene 2.3.6-Tri-*O*-methyl-*D*-galaktose ist bisher nicht kristallin beschrieben worden. Durch papierchromatographischen Vergleich (in den Systemen F, G, H) und durch Vergleich der IR-Spektren mit authent. Substanz konnte die Verbindung jedoch eindeutig identifiziert werden. Ihre Identität ergibt sich auch aus der Isolierung von Lycobiose.

Enzymatische Spaltung mit β -Glucosidase aus Aspergillus wentii: 15 g **2a**, **3a** und **2b**, **3b** (im Gemisch) wurden in 250 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit verd. Salzsäure auf pH 4 eingestellt, einige Tropfen Toluol zugefügt und 25 ccm Enzymlösung zugesetzt. Das Reaktionsgemisch blieb 5 Tage bei Raumtemperatur stehen. Dann wurde das Enzym durch Zufügen von 200 ccm Methanol und 30 min. Erhitzen unter Rückfluß ausgeflockt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, in Wasser suspendiert und mit n-Butanol extrahiert. Ebenso schüttelte man die währ. Phase nach Abdestillieren des Methanols mehrmals mit n-Butanol aus. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Trockne eingeengt und die Substanz an Kieselgel mit System A als Laufmittel aufgetrennt. Dabei erhielt man 2.0 g **1a** und 4.1 g **1b**.

Desgluco-lanatigonin II (1a): Schmp. 246—251° (Zers., aus Methanol), $[\alpha]_D^{25}$: —47.6° ($c = 0.67$, Chloroform/Methanol 1 : 1).

$C_{50}H_{82}O_{22}$ (1035.2) Ber. C 58.02 H 7.99 Gef. C 57.64 H 8.12

Gitonin (1b): Schmp. 276.5—282.5° (Zers., aus Methanol), $[\alpha]_D^{25}$: —56.8° ($c = 0.82$, Chloroform/Methanol 1 : 1).

$C_{50}H_{82}O_{23}$ (1051.2) Ber. C 57.24 H 7.86 Gef. C 56.80 H 7.90

Hydrolyse von 1a und 1b: Je 50 mg 1a und 1b wurden in 10 ccm Dioxan/Wasser 1:1 (3n an HCl) 5 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abdestillieren des Dioxans konnten die Aglykone mit Isobutanol ausgeschüttelt werden. Man engte zur Trockne ein und erhielt nach Umkristallisieren aus Methanol 15 mg Gitogenin vom Schmp. 271–273° und 13 mg Tigogenin vom Schmp. 202–203°, durch Vergleich mit authent. Material eindeutig identifiziert (Misch-Schmp.). In der wäßr. Lösung ließen sich D-Galaktose, D-Glucose und D-Xylose im System E papierchromatographisch nachweisen.

Quantitative Zuckerbestimmung: Zur quantitativen Zuckerbestimmung⁸⁾ wurden je 10 mg 1a und 1b, wie beschrieben, mit methanol. HCl gespalten. Die erhaltenen Methylglykoside wurden in die Silylverbindungen übergeführt. Die gaschromatographische Bestimmung ergab unter Berücksichtigung der Korrekturfaktoren ein molares Zuckerverhältnis von D-Glucose: D-Xylose: D-Galaktose = 1.00: 1.03: 1.98 bzw. 1.00: 1.01: 1.90.

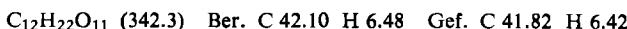
Methylierung von 1a und 1b: Je 250 mg 1a und 1b wurden in je 20 ccm Dimethylsulfoxid gelöst und pro Ansatz 400 mg Natriumhydrid und 1 ccm Methyljodid zugefügt. Alle 12 Stdn. wiederholte man die Zugabe von 200 mg NaH und 1 ccm CH₃J. Nach 3 Tagen wurde wie üblich aufgearbeitet und man erhielt 140 mg permethyliertes 1a bzw. 240 mg permethyliertes 1b, die beide im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr zeigten. Die salzaure Hydrolyse ergab in beiden Fällen als Zucker 2.3.4-Tri-O-methyl-D-xylose, 2.3.4.6-Tetra-O-methyl-D-galaktose, 2.3.6-Tri-O-methyl-D-galaktose und 4.6-Di-O-methyl-D-glucose, wie Vergleich mit authent. Substanz ergab.

2.3.4.6-Tetra-O-methyl-D-galaktose als Anilid: Der erhaltene Sirup (30 mg) wurde in 3 ccm absol. Methanol mit 0.04 ccm Anilin und 2 mg Ammoniumchlorid 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Verdünnen mit Wasser wurde die Reaktionslösung 3mal mit 50 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Der i. Vak. zur Trockne gebrachte Chloroformauszug wurde an Kieselgel im System D chromatographiert. Nach Animpfen kristallisierte das Anilid (18 mg) aus Äther/Petroläther und zeigte nach zweimaligem Umkristallisieren Schmp. 194–196°. Die Substanz war nach Mischprobe und chromatographischem Verhalten identisch mit authent. Material.



Partielle Säurehydrolyse von 1a und 1b: 2.4 g der Mischung von 1a und 1b wurden in 500 ccm Dioxan/0.1 n HCl (1:1) 8 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abdestillieren des Dioxans extrahierte man mehrmals mit Isobutanol zur Gewinnung der zuckerärmeren Glykoside und Sapogenine. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhielt man 1.5 g Glykosidgemisch. Die wäßr. Lösung wurde mit Dowex 3 neutralisiert und ergab nach dem Einengen zur Trockne 0.95 g Zuckergemisch.

Lycobiose: 0.95 g Zuckergemisch wurden auf 5 g Kieselgel aufgezogen und an 75 g Kieselgel chromatographiert. System A mit 10% Methanolzusatz eluierte D-Xylose, D-Galaktose und D-Glucose. System A mit 15% Methanolzusatz eluierte 110 mg Lycobiose, die über Nacht kristallisierte. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol/Wasser/Butanol²⁵⁾ betrug der Schmp. 235–238°. $[\alpha]_D^{25}: +54^\circ \rightarrow +40^\circ (c = 0.5, \text{ Wasser})$. Die Substanz war nach chromatographischem Verhalten (im System E) und Misch-Schmp. identisch mit aus Digitonin¹⁰⁾ erhaltenem Material.



1.5 g des Gemisches der zuckerärmeren Glykoside wurden an 170 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol-Gemischen steigender Polarität (50:1, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1) chromatographiert. Dabei erhielt man neben Tigogenin und Gitogenin 70 mg Monoglykoside (A) und 520 mg Triglykoside (B).

²⁵⁾ R. Kuhn, H. H. Baer und A. Gauhe, Chem. Ber. 89, 1514 (1956).

Methylierung und Hydrolyse der Spaltprodukte A und B: Nach Hydrolyse in Dioxan/2*n* HCl (1:1) konnten in A nur D-Galaktose und in B D-Galaktose und D-Glucose papierchromatographisch im System E nachgewiesen werden. Das obige Material wurde, wie beschrieben, methyliert und aufgearbeitet. Spaltprodukte A ergaben nur 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-D-galaktose, wie der Vergleich mit authent. Substanz zeigte. Spaltprodukte B lieferten 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-D-galaktose, 2.3.6-Tri-*O*-methyl-D-galaktose und 3.4.6-Tri-*O*-methyl-D-glucose. Die Trimethyl-D-glucose konnte papier- und dünnschichtchromatographisch durch Vergleich mit synthetischer²⁶⁾ 3.4.6-Tri-*O*-methyl-D-glucose eindeutig identifiziert werden.

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

[233/72]