

ÜBER DIE PROTOÄSCIGENINESTER AUS ÄSCIN

R. KUHN und I. Löw

Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg

(Received 30 November 1965)

Abstract—Acid hydrolysis of escin yields protoescigenin-21-tiglic acid (angelic acid) ester, protoescigenin-28-tiglic acid (angelic acid) ester and 16-acetyl-protoescigenin.

ÄSCIN, das Saponingemisch aus dem Samen der Rosskastanie *Aesculus hippocastanum* L., enthält in esterartiger Bindung eine gesättigte Säure (Essigsäure bzw. α -Methylbuttersäure bzw. Isobuttersäure) und eine ungesättigte Säure (Tiglinsäure bzw. Angelicasäure).¹ Durch wässrig-alkoholische Salzsäure werden die Zuckerreste abgespalten. Man erhält die Estersapogenine, die nach alkalischer Verseifung Protoäscigenin¹ und Äscinidin² (24-Desoxyprotoäscigenin = Barringtonogenol C³) im Mengenverhältnis 3–4:1 liefern. Wir haben die zuckerfreien Esteraglyka chromatographisch aufgetrennt.⁴ Dabei fanden wir nur Mono-ester von Protoäscigenin und Äscinidin, jedoch keine Ester ihrer Anhydroverbindungen Äscigenin und Anhydro-äscinidin (Barringtonogenol D⁵). Von den Protoäscigeninestern überwiegen mengenmäßig zwei. Den Hauptanteil (ca. 60%) stellt der krist. Protoäscigenin-21-tiglinsäure(angelicasäure)ester; die restlichen 30–40% der krist. Protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)ester zusammen mit dem amorphen Protoäscigenin-28- α -methylbuttersäure (isobuttersäure)ester.

Die Säurereste der Ester identifizierten wir durch Gaschromatographie der mit Alkali abgespaltenen Säuren, sowie durch katalytische Hydrierung der Ester mit $\text{PtO}_2\text{-H}_2$ in Eisessig und quantitative Bestimmung der flüchtigen Säuren nach alkalischer Verseifung. Die Massenspektren lieferten die Molgewichte der Ester sowie die Massen der Säurereste: Mol-peak $m/e = 588$; $\text{M}^+ - \text{Säure} = m/e 588 - 100 = 488$.

Stellung der Tiglinsäurereste

Die bereits angegebenen Haftstellen der Tiglinsäure(Angelicasäure) am Protoäscigenin fanden wir wie folgt. Der Protoäscigenin-21-ester wird von HJO_4 nicht gespalten, da von der Glykolgruppierung an C-21 und C-22 ein Hydroxyl verestert ist. Der 28-Ester wird von HJO_4 gespalten, seine Glykolgruppierung ist frei. Beide Ester liefern im Massenspektrum aus $\text{M}^+ 588$ das gleiche Retrodien — 18-Spaltstück $m/e 346$. Daraus folgt, dass beide Ester den Säurerest nur an den Ringen D oder E tragen können. Wir haben beide Ester mit Aceton-CuSO₄ in die Isopropylidenverbindungen übergeführt und die Estergruppen alkalisch verseift. Die aus den Estern bevorzugt gebildeten Monoaceton-protoäscigenine waren nicht identisch. Ferner erhielten wir

¹ R. Kuhn und I. Löw, *Liebigs Ann.* **669**, 183 (1963).

² R. Kuhn und I. Löw, *Tetrahedron Letters* 891 (1964).

³ R. Tschesche und G. Wulff, *Tetrahedron Letters*, 1569 (1965).

⁴ Vergleiche auch R. Tschesche, U. Axen und G. Snatzke, *Liebigs Ann.* **669**, 171 (1963).

⁵ S. K. Chakraborti und A. K. Barua, *Tetrahedron* **19**, 1727 (1963).

⁶ L. Caglioti, G. Cainelli und F. Minutilli, *Gazz. Chim. Ital.* **11**, 1387 (1949).

⁷ C. Wünsche und I. Löw, *Tetrahedron* **22**, 1893 (1966).

zwei verschiedene Diaceton-protoäscigenine. Beide Monoaceton-protoäscigenine wurden von HJO_4 nicht gespalten. Eine dritte, mit HJO_4 spaltbares Monoaceton-protoäscigenin, war in beiden Fällen nur in kleinen Mengen entstanden.

TABELLE 1. PROTOÄSCIGENINESTER

	Formel	Summenformel	Schmp.	$[\alpha]_D^{20}$ in DMF	R_f^*	HJO_4 Probe ^a
I	Protoäscigenin-21-tiglinsäure-ester	$\text{C}_{48}\text{H}_{84}\text{O}_7$ (588·8)	247°	+23·5° [†]	1·75 2·0 [‡]	—
	Protoäscigenin-21- α -methylbuttersäure-ester	$\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{O}_7$ (590·8)	223°		1·9	—
II	Protoäscigenin-28-tiglinsäure-ester	$\text{C}_{48}\text{H}_{84}\text{O}_7$ (588·8)	170°	+32·0°	1·4	+
	Protoäscigenin-28- α -methylbuttersäure-ester	$\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{O}_7$ (590·8)	145°		1·4	+
III	Protoäscigenin-16-acetat	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_7$ (548·7)	195°		0·5	+

* R_f -Wert in Essigester + 1% Methanol bezogen auf Äscigenin = 1·0.

† in absolut. Äthanol: +37·5°. ‡ Doppelfleck

Wir haben zum Vergleich Protoäscigenin mit Aceton- CuSO_4 behandelt und erhielten drei Monoaceton-protoäscigenine; davon waren zwei mit HJO_4 nicht spaltbar, eines war spaltbar. Daneben fanden wir zwei Diaceton-protoäscigenine. Das mengenmässig überwiegende linksdrehende Monoaceton-protoäscigenin (IV) war identisch mit dem aus Protoäscigenin-21-tiglinsäure(angelicasäure)ester erhaltenen, das rechtsdrehende Monoaceton-protoäscigenin (V) mit dem aus Protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)ester. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung der Protoäscigenin-aceton-verbindungen.

TABELLE 2. ACETONVERBINDUNGEN

Name	Summenformel	Schmp.	$[\alpha]_D^{20}$	HJO_4
22,28-Aceton-protoäscigenin(IV)	$\text{C}_{48}\text{H}_{84}\text{O}_6$ (546·7)	210°	-3·3°(DMF)	—
IV-tetraacetat	$\text{C}_{44}\text{H}_{88}\text{O}_{10}$ (714·9)	218°	-2·5°(Chlf.)	—
16,21-Aceton-protoäscigenin(V)	$\text{C}_{48}\text{H}_{84}\text{O}_6$ (546·7)	210°	+14·3°(DMF)	—
V-tetraacetat	$\text{C}_{44}\text{H}_{88}\text{O}_{10}$ (714·9)	130°	+32·0°(Chlf.)	—
3,24-Aceton-protoäscigenin	$\text{C}_{48}\text{H}_{84}\text{O}_6$ (546·7)	290°		+
3,24;22,28-Diaceton-protoäscigenin	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_6$ (586·8)	175°		—
3,24;16,21-Diaceton-protoäscigenin	$\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_6$ (586·8)	270°		—

Die Lokalisierung der durch den Isopropylidenrest überbrückten Hydroxyle am Protoäscigenin gelang mit Hilfe der NMR-Spektren der peracetylierten Monoaceton-protoäscigenine IV und V. In Tabelle 3 sind die δ -Werte (in ppm bezogen auf TMS) der Protonenresonanzsignale für die Protonen an C-12 (Vinylproton), C-3, C-16, C-21, C-22, C-24 und C-28 aufgeführt. Zum Vergleich haben wir die Zahlen für Hexaacetyl-protoäscigenin* und Tetraacetyl-äscigenin** (3,22,24,28-Tetraacetyl-16,21-oxido- Δ^{12} -oleanen) hinzugefügt.

TABELLE 3. δ -WERTE DER PROTONENRESONANZSIGNALE, ANGEgeben IN PPM, BEZOGEN AUF TMS = 10-0.
GERÄT VARIAN HR 100, SEITENBANDTECHNIK

C-Atom Nr.	12	16	21	22	3	24	28
Anzahl der Protonen	1	1	1	1	1	2	2
Hexaacetyl-protoäscigenin	5.3	5.3	5.3	5.3	4.53	4.23	3.73
	M	M	M	M	T	AB	br. S
Tetraacetyläscigenin	5.4	4.3	3.65	5.4	4.6	4.3	4.0
			S	S	T	AB	br. S (AB)
16,21-Aceton-protoäscigenin- 3,22,24,28-tetraacetat (V-tetraacetat)	5.35	3.76	4.05	5.22	4.50	4.28	4.07
	M	br. T	D	D	T	AB	br. S
22,28-Aceton-protoäscigenin- 3,16,21,24-tetraacetat (IV-tetraacetat)	5.85	5.3	5.36	3.82	4.59	4.25	3.54
	M	M	D	D	T	AB	AB
	C-12 od.	C-12 od.	J ~ 11 Hz	J ~ 11 Hz			4 Linien
3,21,22,24,28-Pentaacetyl- protoäscigenin	C-16	3 Protonen	5.3		4.5	4.3	3.7
			M		T	AB	br. S
Hexaacetyl-protoäscigenin (in C_6D_6)	5.24	5.48	5.62	5.62	4.65	4.39	3.89
			scharf.	scharf.	T	AB	AB
3,21,22,24,28-Pentaacetyl- protoäscigenin (in C_6D_6)	5.27	<3.0	5.85	5.85	4.67	4.34	3.82
			AB	AB	T	AB	AB
			J ~ 5 Hz	J ~ 5 Hz			

Lösungsmittel $CDCl_3$, für die letzten beiden Spektren C_6D_6 .

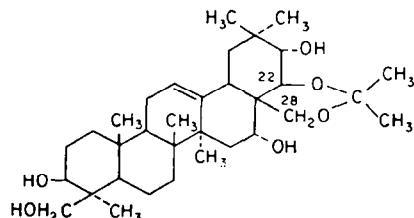
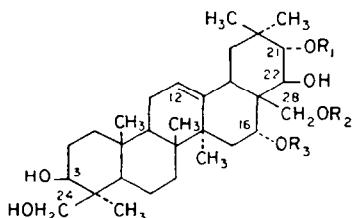
M = Multiplett, T = Tripplett, D = Doublett, S = Singlett.

Das acetylierte linksdrehende Monoaceton-protoäscigenin IV zeigt die Signale für ein axiales Proton an C-3 (Tripplett bei $\delta = 4.59$) und für zwei Protonen an C-24 (AB bei 4.25). Erheblich verändert gegenüber Hexaacetyl-protoäscigenin sind die Signale für ein Proton an C-22 (Doublett bei 3.82 gegen Multiplett bei 5.3) und für zwei Protonen an C-28 (AB bei 3.54 gegen breites Singlett bei 3.73), während die Signale für die drei Protonen an C-12, C-16 und C-21 (5.3–5.85 gegen 5.3) gleichartig sind. Daraus folgt für das linksdrehende Monoaceton-protoäscigenin die Formel IV des 22,28-Aceton-protoäscigenins. Da diese Acetonverbindung aus demjenigen Protoäscigeninester entsteht, der keine freie Glykolgruppierung besitzt, und die Esterbindung bei der Acetonierung zunächst erhalten bleibt, kann der Protoäscigenin-ester vom Schmp. 247° den Rest der Tiglinsäure (Angelicasäure) entsprechend Formel I nur an C-21 tragen.

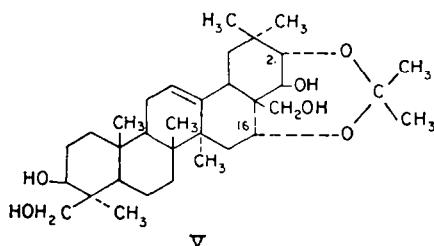
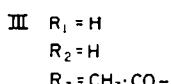
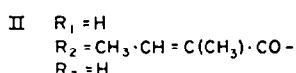
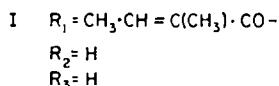
Das rechtsdrehende Monoaceton-protoäscigenin V zeigt nach Acetylierung wieder die Signale für ein axiales Proton an C-3 (Tripplett bei 4.50) und für zwei Protonen an C-24 (AB bei 4.28). Stark verändert gegenüber Hexaacetyl-protoäscigenin (Multiplett bei 5.3) sind die Signale für das Proton an C-16: breites Tripplett bei 3.76 und für das Proton an C-21: Doublett bei 4.05. Die zwei Protonen an C-28

* Vergleiche auch Fussnote 3.

erscheinen in beiden Fällen als breites Singlett bei 4.07 bzw. 3.72. Das rechtsdrehende Monoaceton-protoäscigenin ist also 16,21-Aceton-protoäscigenin (V). Da V aus dem durch HJO_4 spaltbaren Ester vom Schmp. 170° hervorgeht und bei der Acetonierung die Estergruppe zunächst erhalten bleibt, kann der durch HJO_4 spaltbare Ester den Rest der Tiglinsäure nur entsprechend Formel II an C-28 tragen. Das dritte, mit HJO_4 spaltbare Monoaceton-protoäscigenin kann nur 3,24-Aceton-protoäscigenin sein. Retrodien aus $\text{M}^+ 546$: $m/e 282$ wie bei Protoäscigenin.



IV



V

Stellung der Acetoxygruppe

In den salzsäuren Hydrolysaten des Äscins fanden wir weder Diacyl-protoäscigenine bzw. Diacyl-äscinidine noch ein Acetyl-protoäscigenin. Die "labile" Essigsäure konnte wie bei Herzglykosiden mit einem Hydroxyl der Zuckerreste verestert sein. Hydrolysiert man Äscin durch Erhitzen mit 80-proz. Ameisensäure und "entformyliert" man anschließend mit N/100 Salzsäure in 90-proz. Methanol, so erhält man vorwiegend Protoäscigenin- und Äscinidin-diester. Durch Chromatographie haben wir das Gemisch in drei Fraktionen aufgetrennt. Gefunden wurden (nach alkalischer Verseifung) 12.5–16.0% "Acetyl" (ber. für Diacylprotoäscigenin 13.6% "Acetyl"). Im Gaschromatogramm fanden wir Tiglinsäure, Angelicasäure, α -Methylbuttersäure, Isobuttersäure und Essigsäure. Fraktion I, die schnellste im Dünnschichtchromatogramm, enthielt die Äscinidin-ester, Fraktion II Protoäscigenin-diester und Äscinidin-ester und Fraktion III, die langsamste, praktisch nur Protoäscigenin-diester. Sie nahm bei der katalytischen Hydrierung 0.94 Mole H_2 auf; der "Acetyl"-Wert nach alkalischer Verseifung war 13.5% (ber. für eine Tiglinsäure und eine Essigsäure 13.6%). Der Protoäscigenin-diester (amorph) gab keinen Mol-peak bei $m/e 630$. Durch Stehenlassen mit 0.5 Äquiv. 0.02 n methanolischer KOH wurde die ungesättigte Säure abgespalten und ein Gemisch aus Protoäscigenin und Acetylprotoäscigenin erhalten, das wir chromatographisch trennen konnten. Das erhaltene

Acetyl-protoäscigenin (Tabelle 1, HJO_4 -Probe: +) ist auf Grund der Fragmentierung im Massenspektrum (Tabelle 4) 16-Acetyl-protoäscigenin (III).⁷

Während Protoäscigenin und Äscinidin (24-Desoxy-protoäscigenin) im Massenspektrum das Retrodienspaltstück m/e 282 liefern, fehlt bei Acetyl-protoäscigenin dieses Bruchstück. Man findet Retrodien aus $M-60 = m/e$ 264, entsprechend dem Retrodien $M-18 = m/e$ 264 aus Protoäscigenin und Äscinidin. Das beweist, dass die

TABELLE 4. CHARAKTERISTISCHE BRUCHSTÜCKE m/e AUS DEN MASSENSPEKTREN. $M^\oplus = \text{MOL-PEAK}$,
R = RETRODIEN

	M^\oplus	M-60	R	R-18	R-18-18	R-18-18-31
Protoäscigenin $C_{30}H_{50}O_6$ (506-7)	506	—	282	264	246	215
Äscinidin $C_{30}H_{50}O_6$ (490-7)	490	—	282	264	246	215
16-Acetyl-protoäscigenin $C_{28}H_{52}O_7$ (548-7)	548	488	—	264 (R-60)	246 (R-60-18)	215 (R-60-18-31)

veresterte Hydroxylgruppe an den Ringen D oder E haftet, an C-16, C-21, C-22 oder C-28. Die Hydroxyle an C-21 und C-22 scheiden aus wegen der Spaltbarkeit mit HJO_4 . Die CH_2OH -Gruppe an C-17 (Hydroxyl an C-28) wird ausgeschlossen: erstens durch den Übergang m/e 246 – 31 = 215; zweitens durch das NMR-Spektrum von Acetylprotoäscigenin, welches neben 1 Vinylproton (an C-12) 1 CHO-Acetyl-Proton, breites Singlett bei δ 5.29 und δ 5.14 ppm in deuteriertem DMSO, anzeigt, das einer CH_2 -Gruppe benachbart ist (an C-3 oder C-16). Im NMR-Spektrum von Protoäscigenin in deuteriertem DMSO liegt das Signal für das Vinylproton an C-12 bei δ 5.19 ppm (breites Singlett).

Verfolgt man die schonende Verseifung des Protoäscigenin-diesters (aus Fraktion III), die zum 16-Acetyl-protoäscigenin führt, dünnenschichtchromatographisch, so findet man intermediär den Doppelfleck für Protoäscigenin-21-tiglinsäure(angelicasäure)-ester, nicht aber den Fleck für Protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)-ester. Es gibt also ein Äscin, welches 16-Acetyl-protoäscigenin-21-tiglinsäure(angelicasäure)-ester als Baustein enthält. Ob der Acetoxyrest im Acetyl-protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)-ester (enthalten in der Diester-Fraktion II) ebenfalls an C-16 steht, können wir nicht sagen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Zur Säulenchromatographie diente Al_2O_3 W (saures Aluminiumoxyd von Woelm, inaktiviert durch Versetzen mit 10% Wasser) und Al_2O_3 B (Aluminiumoxyd Merck, standardisiert nach Brockmann, inaktiviert durch Liegenlassen an der Luft). Die Lösungsmittel Chloroform und Essigester waren mit Wasser gewaschen. SiO_2 H (Merck) war Träger für die Dünnschichtchromatogramme. Die Flecken haben wir durch Anspritzen mit 2N H_2SO_4 und Erhitzen auf 140° sichtbar gemacht. Chlf. = Chloroform, E. = Essigester, Meth. = Methanol, Bzl. = Benzol, Ä. = Äther, A. = Äthanol, DMF = Dimethylformamid, Py. = Pyridin, DC = Dünnschichtchromatogramm. $R_{\text{Ascigenin}} = R_F$ -Werte in E. bezogen auf Äscigenin = 1.0. $R_F^+ = R_F$ -Werte bezogen auf 22,28-Monoaceton-äscigenin = 1.0 in E./Bzl. 3/1. $R_{\text{TAA}} = R_F$ -Werte bezogen auf Tetraacetyl-äscigenin = 1.0 in Bzl./Ä. 3/1. $R_{f0} = R_F$ -Wert in Bzl./E. = 1/1.

Analysenpräparate wurden 1 Stunde bei 110°/0.001 Torr über P_2O_5 getrocknet. Die Acylwerte wurden nach alkalischer Verseifung unter Zusatz von Pyridin nach Wiesenberger⁸ gewonnen. Sie sind in Prozenten "Acetyl" angegeben. Die Isopropylidenbestimmungen erfolgten nach Kuhn und

⁸ E. Wiesenberger, *Mikrochemie* 33, 41 (1947).

Roth.⁹ Die Schmelzpunkte wurden im Berl-Block mit kurzen Thermometern gemessen, die Drehungen in 1-proz. Lösungen im 2-dm-Rohr. Glykolprobe mit HJO_4 ⁷ haben wir mit 5-mg-Proben durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde im Dünnschichtchromatogramm vergleichend mit der Ausgangssubstanz geprüft.

Isolierung der Protoäscigeninester

Krist. Äscin (10 g) wurde in 100 ccm 50-proz. Äthanol, 2 N an HCl , 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Zusatz von 200 ccm Wasser wurden die ausgesunkenen Sapogeninester (4.5 g) auf 120 g Al_2O_3 , W chromatographiert. Nach dem Vorwaschen der Säule mit Chlf. erhielten wir mit Chlf. + 2% Meth. 1.4 g Äscinidester (Barringtogenol C-ester; $R_{\text{Ascigenin}} > 2.0$, anschliessend Protoäscigeninester II ($R_{\text{Ascigenin}} 1.4$), 0.5 g Protoäscigeninester-Gemisch $R_{\text{Ascigenin}} = 1.1$), mit Chlf. + 10% Meth. 1.7 g Protoäscigeninester I ($R_{\text{Ascigenin}} = 2.0 + 1.75$) und mit Chlf. + 20% Meth. 10 mg langsamere Fraktionen ($R_{\text{Ascigenin}} < 1.0$); sie enthalten Protoäscigenin, Äscinidin und Acetyl-protoäscigenin.

Protoäscigenin-21-tiglinsäure(angelicasäure)ester (Protoäscigeninester I). Wir haben aus dem Rohkristallizat durch Behandeln mit Chlf. und Aceton lösliche Begleiter abgetrennt und das Unlösliche aus Meth.-Wasser umkristallisiert. Nadeln vom Schmp. 247°, $[\alpha]_D^{20} = +23.5^\circ$ (in DMF), $[\alpha]_D^{20} = +37.5^\circ$ (in absolut. A.). [Protoäscigenin: $[\alpha]_D^{20} = +17.5^\circ$ (in DMF), $[\alpha]_D^{20} = +30.5^\circ$ (in absolut. A.).] IR-Spektrum: Estercarbonylbanden bei 5.90, 7.90 und 8.05 μ , Doppelbindung bei 6.05 μ ; Massenspektrum: Mol-peak bei m/e 588. ($\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}, 1\text{H}_2\text{O}$ (606.8) Ber: C, 69.27; H, 9.63; Acyl, 7.1; Gef: C, 69.32; H, 9.33; Acyl, 7.09%). Nach alkalischer Verseifung erhielten wir Protoäscigenin.

Identifizierung des Säurerestes. Ester I (10 mg) wurde in 1 ccm 0.5 N meth. KOH 45 Min. gekocht und die Säuren nach Ansäuern mit HCl in Äther aufgenommen. Die getrocknete ätherische Lösung haben wir vorsichtig abgedampft, den Rückstand in 0.1 ccm Chlf. aufgenommen und gaschromatographisch untersucht.¹ Wir fanden Tiglinsäure und Angelicasäure im Mengenverhältnis 3:2.

Hydrierung. Ester I (3.5 mg) nahm mit vorhydriertem PtO_4 in Eisessig in 10 Min. 0.98 Moläquiv. H_2 auf. Der Dihydroester ($R_{\text{Ascigenin}} 1.9$ F) zeigte nach alkalischer Verseifung im Gaschromatogramm nur den peak für α -Methylbuttersäure. Durch präparative Hydrierung von Protoäscigeninester I erhielten wir Protoäscigenin-21- α -methylbuttersäureester, aus -Wasser Nadeln vom Schmp. 223°. ($\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}, 1.5\text{H}_2\text{O}$ (617.82) Ber: C, 68.25; H, 9.66; Gef: C, 68.14; H, 9.58%). IR-Spektrum: Estercarbonylbanden bei 5.85, 7.90-8.00 μ . Keine Doppelbindungsbande. Der Protoäscigenin-21-tiglinsäure (angelicasäure)ester war im direkten Vergleich mit Desglykoäscin⁴ (R_F -Wert und IR-Spektrum) identisch.

Protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)ester (Protoäscigeninester II). Wir haben die Protoäscigeninester II-Fraktion erneut auf Al_2O_3 , W chromatographiert. Der dann im DC einheitliche Ester II kristallisierte nur teilweise (in Quadern aus Methanol + Wasser; ein beträchtlicher Anteil blieb amorph). Schmp. 170°, $[\alpha]_D^{20} = +32.0^\circ$ (in DMF), IR-Spektrum: Estercarbonylbanden bei 5.85, 7.95 und 8.10 μ , Doppelbindung bei 6.05 μ . Massenspektrum: Mol-peak bei m/e 588; nach alkalischer Verseifung erhielten wir Protoäscigenin, das Gaschromatogramm der abgespaltenen Säuren zeigte Tiglinsäure und Angelicasäure. ($\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}$, (588.8) Ber: C, 71.39; H, 9.59; Acyl 7.3; Gef: C, 70.90; H, 9.71; Acyl, 7.08%).

Hydrierung. Mit $\text{PtO}_4 \cdot \text{H}_2$ in Eisessig wurden in 60 Min. 1.01 Mole H_2 aufgenommen. Der amorphe Protoäscigenin-28- α -methyl-buttersäureester, Schmp. 145° zeigte $R_{\text{Ascigenin}} = 1.4$. Im IR-Spektrum lagen die Estercarbonylbanden bei 5.80, 7.90-8.05 μ ; keine Doppelbindungsbande.

Der amorphe Protoäscigeninester II lieferte nach alkalischer Verseifung ein Säuregemisch, dessen Gaschromatogramm neben Tiglinsäure und Angelicasäure erhebliche Mengen von α -Methylbuttersäure und Isobuttersäure, aber keine Essigsäure anzeigen.

Die Protoäscigeninester-Fraktion von $R_{\text{Ascigenin}} = 1.1$ kristallisierte nicht. Nach alkalischer Verseifung fanden wir Protoäscigenin und Äscinidin, im Gaschromatogramm der abgespaltenen Säuren Tiglinsäure, Angelicasäure, α -Methylbuttersäure und Isobuttersäure.

16-Acetylprotoäscigenin (III). Äscin (10 g) wurde mit 75 ccm 80-proz. Ameisensäure 4 Std. gekocht. Nach dem Abdampfen im Vakuum und Aufnehmen in 100 ccm Chlf. + 15 ccm Meth. wurde viermal mit je 30 ccm Wasser gewaschen und die Chloroformlösung abgedampft. Den Sirup haben wir 2 Std. mit 45 ccm Meth. + 5 ccm N/10 HCl gekocht, mit 125 ccm Chlf. versetzt und

⁹ R. Kuhn und H. Roth, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **65**, 1285 (1932).

viermal mit je 30 ccm Wasser gewaschen. Die Chlf. Lösung wurde abgedampft und der Rückstand (6 g) zweimal auf Al_2O_3 , W in Chlf. + 0-10% Meth. chromatographiert. Wir erhielten mit Chlf. 2-2 g schnelle Ester (vorwiegend Äscinidinester enthaltend) $R_f \geq 4-0$,* mit Chlf. + 1-10% Meth. 1-9 g Protoäscigenin-ester, $R_f 3-5$ u. 3-1,* davon 0-65 g ($R_f 3-1$ *) frei von Äscinidin-estern, und mit Chlf. + 10% Meth. 0-75 g Protoäscigenin-monoester. Wir haben 140 mg der Protoäscigenin-diesterfraktion $R_f 3-1$ * mit 5 ccm 0-02 N methanol. KOH stehen lassen. Nach 17 Stdn. haben wir mit 25 ccm Chlf. versetzt und viermal mit je 5 ccm Wasser gewaschen. In der Zwischenschicht waren 30 mg Protoäscigenin ausgefallen. Die Chlf. Lösung (110 mg) haben wir auf Al_2O_3 , W in Chlf. + 5% Meth. chromatographiert und anschliessend durch präparative Dünnschichtchromatographie 30 mg 16-Acetylprotoäscigenin, Schmp. 195°, abgetrennt (20×20 cm Platten, 1-mm-Schicht von SiO_2 , H, Laufmittel Essigester + 2% Meth.), ($\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{O}_6$ 0-5 CH_3OH (564-8) Ber: C, 69-11; H, 9-64; Gef: C, 69-01; H, 9-47% Mol-peak bei m/e 548, Ber: für $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{O}_6$, 548-7). Ein aus 450 mg Hexaacetylprotoäscigenin mit 6 ccm N/10 methanol. KOH (24 Stdn. bei 20°) gewonnenes Monoacetylprotoäscigenin (125 mg) $R_{\text{Ascigenin}}$ = 0-5, Schmp. 195°, war im IR- und NMR-Spektrum von 16-Acetylprotoäscigenin nicht zu unterscheiden. Es enthielt aber, wie aus einer zweiten Fragmentierungsreihe im Massenspektrum hervorgeht, noch 3-Acetylprotoäscigenin.

Acetonverbindungen

Isolierung von äscinidinfreiem Protoäscigenin. Sie gelang am besten, wenn wir die Estersapogenine alkalisch verseiften, das Sapogeningemisch auf Al_2O_3 , W in E. + 1-10% Meth. chromatographierten, das anfallende Protoäscigenin, welches gewöhnlich noch Äscinidin und Äscigenin enthält, durch einstündiges Kochen mit Acetanhydrid + 0-10% Py. anacetylierten und nach Zugabe von *p*-Toluolsulfinsäure (10% des eingesetzten Sapogenins) 30 Min. auf 110° erhitzen. Dabei geht Protoäscigenin quantitativ in sein Hexaacetat, Äscinidin quantitativ in sein Pentaacetat und Tetraacetyl-äscigenin in Pentaacetyl-isoäscigenin¹⁰ über. Die chromatographische Trennung gelingt glatt.¹ Das mit Acetanhydrid + Py. entstehende "anacetylierte" Protoäscigenin ist nicht ein Tetraacetylprotoäscigenin, wie früher⁸ angenommen wurde, sondern 3,21,22,24,28-Pentaacetylprotoäscigenin. Aus Methanol Kristalle vom Schmp. 131°, $[\alpha]_D^{20} = +20-0$ in Chlf. $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_{11}$ (716-9), Mol-peak im Massenspektrum bei m/e 716. NMR-Spektrum in CDCl_3 : bei δ 5-3 3 Protonen, davon 1 Vinylproton (an C-12), 2 CH_2O -Acetylprotonen (an C-21, C-22 oder C-16); bei δ 4-5 1 Proton (an C-3), bei δ 4-3 2 Protonen für CH_2O -Acetyl (an C-24) und bei δ 3-7 2 Protonen für CH_2O -Acetyl (an C-28). Das NMR-Spektrum in C_6D_6 zeigt 2 Protonen bei δ 5-85 als AB-Spektrum, die miteinander koppeln ($J \sim 5$ Hz); sie sind C-21 und C-22 zuzuordnen. Das Signal für CHOH an C-16 ist nach $\delta < 3-00$ verschoben.

Wir haben 0-6 g Protoäscigenin in 30 ccm Aceton (p.A.) mit 6 g wasserfreiem Kupfersulfat 50 Stdn. geschüttelt. Dann wurde abfiltriert, gut mit Aceton nachgewaschen und abgedampft. Den Rückstand haben wir mit Chlf. behandelt und das unlösliche (Protoäscigenin) erneut mit CuSO_4 in Aceton geschüttelt. Wir erhielten so 300 mg Protoäscigenin zurück. Den in Chlf. löslichen Anteil (325 mg) haben wir auf Al_2O_3 , B in Chlf. + 1-10% Meth. chromatographiert. Wir erhielten mit Chlf. + 1% Meth. 25 mg Diacetonprotoäscigenin mit $R_f^+ = 1-33$; 10 mg Diacetonprotoäscigenin mit $R_f^+ = 1-20$; 160 mg Acetonprotoäscigenin(IV) $R_f^+ = 0-65$; mit Chlf. + 1-10% Meth. 60 mg Acetonprotoäscigenin(V) $R_f^+ = 0-46$; mit Chlf. + 10% Meth. ein Acetonprotoäscigenin von $R_f^+ = 0-21$.

3,24,22,28-Diacetonprotoäscigenin ($R_f^+ = 1-33$). Nicht kristallisiert, Schmp. ca. 170°. ($\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{O}_6$ 0-5 H_2O (595-8) Ber: C, 72-56; H, 9-98; Isopropyliden, 13-9; Gef: 72-62; H, 9-92; Isopropyliden, 13-16%).

22,28-Acetonprotoäscigenin (IV). Aus Methanol derbe Prismen vom Schmp. 210°, $[\alpha]_D^{20} = -3-3^\circ$ (in DMF), HJO_4 -Probe:—. ($\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{O}_6$ 0-5 H_2O (555-8) Ber: C, 71-33; H, 9-98; Isopropyliden, 7-55; Gef: C, 71-52; H, 9-82; Isopropyliden, 7-03%).

3,16,21,24-Tetraacetyl-22,28-acetonprotoäscigenin. Wir haben 60 mg der voranstehenden Acetonverbindung in 1 ccm Acetanhydrid 1 Stde. unter Rückfluss gekocht und das Acetylierungsprodukt auf Al_2O_3 , B chromatographiert. Wir erhielten mit Bzl.-Ä. (9:1 Vol.) 40 mg des Tetraacetates, $R_{\text{TAA}} = 1-04$; aus Methanol Nadelchen vom Schmp. 218°, $[\alpha]_D^{20} = -2-5^\circ$ (in Chlf.);

* $R_f = R_f'$ -Werte bezogen auf Äscigenin 1-0 in E./ Bzl. 3/1 Vol.; R_f für Protoäscigenin-21-tiglin säureester 1-8 u. 2-3.

¹⁰ L. Ruzicka, W. Baumgartner und V. Prelog, *Helv. Chim. Acta* 32, 2069 (1949); J. B. Thomson, *Tetrahedron Letters* 2229 (1965).

Mol-peak bei m/e 714. ($C_{41}H_{68}O_{10}$ (714.9) Ber: C, 68.88; H, 8.74; Gef: C, 68.59; H, 8.71%).

16,21-Aceton-protoäscigenin (V). Aus Methanol Nadeln vom Schmp. 205°, $[\alpha]_D^{20} = +14.3^\circ$ (in DMF), HJO_4 :-, $C_{33}H_{54}O_8 \cdot 1 H_2O$ 564.8 Ber: C, 70.17; H, 9.99; Isopropyliden, 7.45; Gef: C, 70.41; H, 10.03; Isopropyliden, 6.96%).

3,22,24,28-Tetraacetyl-16,21-aceton-protoäscigenin. Aus 50 mg der voranstehenden Acetonverbindung erhielten wir wie oben nach chromatographischer Reinigung 45 mg des Tetraacetates, $R_{TAA} = 1.13$ vom Schmp. 130°, $[\alpha]_D^{20} = +32.0^\circ$ (in Chlf.); im IR-Spektrum "Äscigeninbande" bei $8.95 \mu^{10}$. ($C_{41}H_{68}O_{10} \cdot 0.5 CH_3OH$ (730.9) Ber: C, 68.18; H, 8.82; Gef: C, 68.16; H, 8.90% Mol-peak im Massenspektrum bei m/e 714.) Die Acetylverbindung kristallisierte nicht.

Acetonverbindungen aus Protoäscigenin-21-tiglinsäure (angelicasäure)ester. Protoäscigeninester (I; 300 mg) wurden in 25 ccm Aceton mit 3 g $CuSO_4$ 50 Stdn. geschüttelt, 80 mg nicht umgesetzter Ester blieben in Chlf. unlöslich. Die Chloroformlösung, enthaltend 270 mg Substanz, haben wir auf Al_2O_3 B chromatographiert. Waschen der Säule mit Chlf. lieferte 25 mg 3,24,22,28-Diaceton-protoäscigenin-21-tiglinsäure(angelicasäure)ester, $R_f^0 > 0.9$; nach alkalischer Verseifung stimmte der R_f^+ -Wert 1.33 mit dem des aus Protoäscigenin direkt gewonnenen Diaceton-protoäscigenins überein.

Mit Chlf. + 1% Meth. wurden 175 mg 22,28-Aceton-protoäscigenin-21-tiglinsäure(angelicasäure)ester ($R_f^0 = 0.38$) eluiert und mit Chlf. + 5% Meth. 50 mg Ester I. Beim Stehenlassen einer Probe des Aceton-protoäscigeninesters in 0.1 ccm einer Mischung von 10 ccm Meth. + 1 Tropfen konz. HCl war nach 30 Min. der Acetonrest vollständig abgespalten. Wir erhielten Protoäscigeninester I zurück. Verseifung. 100 mg des Monoacetonesters haben wir in 5 ccm 2 N methanol. KOH 90 Min. unter Rückfluss gekocht. (Einstündiges Kochen mit 0.5 N methanol. KOH spaltete die Tiglinsäure (Angelicasäure) nicht ab.) Nach Chromatographie auf Al_2O_3 B in Chlf. + 0-10% Meth. erhielten wir 22,28-Aceton-protoäscigenin in derben Prismen vom Schmp. 210°. Es stimmte im $R_f^+ = 0.65$ und im IR-Spektrum mit dem aus Protoäscigenin direkt gewonnenen Aceton-protoäscigenin (IV) überein. ($C_{33}H_{54}O_8 \cdot 0.5 H_2O$ (555.8) Ber: C, 71.33; H, 9.98; Gef: C, 71.53; H, 9.97%).

Acetonverbindungen aus Protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)ester. Wir haben 300 mg Protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)ester zweimal nacheinander mit 3 g $CuSO_4$ in 20 ccm Aceton je 40 Stdn. geschüttelt und das in Chlf. vollständig lösliche Reaktions-gemisch auf Al_2O_3 B in Chlf. + 0-10% Meth. chromatographiert. Waschen der Säule mit Chlf. lieferte 125 mg 3,24,16,21-Diaceton-protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)ester, $R_f^0 \sim 0.9$; mit Chlf. + 1% Meth. eluierten wir 120 mg 16,21-Aceton-protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)ester, $R_f^0 = 0.34$ und 64 mg 3,24-Aceton-protoäscigenin-28-tiglinsäure(angelicasäure)ester $R_f^0 = 0.23$. Mit Chlf. + 10% Meth. erhielten wir schliesslich 55 mg nicht umgesetzten Protoäscigeninester II zurück ($R_f^0 = <0.2$).

3,24,16,21-Diaceton-protoäscigenin. Aus der Diaceton-verbindung des Protoäscigeninesters II ($R_f^0 \sim 0.9$) durch 90 min. Erhitzen mit 2N methanol. KOH. Aus Methanol Nadeln vom Schmp. 270°, $R_f^+ = 1.20$. ($C_{33}H_{54}O_8 \cdot 1 H_2O$ (640.8) Ber: C, 71.48; H, 10.00; Isopropyliden, 13.9; Gef: C, 71.27; H, 10.02; Isopropyliden, 13.66%).

16,21-Aceton-protoäscigenin (V). Aus der Monoacetonverbindung des Protoäscigeninesters II ($R_f^0 = 0.34$) durch alkalische Verseifung. Aus Methanol Nadeln vom Schmp. 205°, $R_f^+ = 0.46$. ($C_{33}H_{54}O_8 \cdot 1 H_2O$ (564.8) Ber: C, 70.17; H, 9.99; Isopropyliden, 7.45; Gef: C, 70.41; H, 10.03; Isopropyliden, 6.96%).

3,22,24,28-Tetraacetyl-16,21-aceton-protoäscigenin. Aus 50 mg der Acetonverbindung erhielten wir nach Kochen mit Acetanhydrid durch Chromatographie auf Al_2O_3 B in Bzl.-Ä. (9/1 Vol.) 45 mg des Tetraacetates. $R_{TAA} = 1.13$, Schmp. 130°, im IR-Spektrum "Äscigenin"-Bande bei $8.95 \mu^{10}$. ($C_{41}H_{68}O_{10} \cdot 0.5 CH_3OH$ (730.9) Ber: C, 68.18 H, 8.82; Gef: C, 68.16; H, 8.90%).

3,24-Aceton-protoäscigenin (Aceton-protoäscigenin von $R_f^+ = 0.21$). Durch alkalische Verseifung des Aceton-protoäscigeninesters von $R_f^0 = 0.23$. Au Methanol Nadeln vom Schmp. 290°, $R_f^+ = 0.21$, HJO_4 -Probe: +. ($C_{33}H_{54}O_8 \cdot 1 H_2O$ (564.8) Ber: C, 70.17; H, 9.99; Isopropyliden, 7.45; Gef: C, 70.23; H, 9.77; Isopropyliden, 7.77%).

Herrn Dr. W. Otting danken wir für die IR-Spektren, Herrn Dr. U. Scheidegger (Zürich) und Herrn Dr. J. Jochims für die NMR-Spektren (Gerät Varian HR 100, Eichung mit Seitenbandtechnik). Für die Überlassung von Äscin danken wir den Firmean A. Klinger u. Co., München, und Dr. R. Madaus, Köln.