

ÜBER TRITERPENE—XXVI¹

ÜBER DIE STRUKTUR DER ROSSKASTANIENSAPONINE (AESCIN) UND DIE AGLYKONE VERWANDTER GLYKOSIDE

G. WULFF und R. TSCHESCHE

aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Bonn

(Received in Germany 16 August 1968; Received in the UK for publication 22 August 1968)

Zusammenfassung—Das kristalline Hauptsaponin "Aescin" aus den Samen von *Aesculus hippocastanum L.* stellt ein komplexes Gemisch dar, dessen Einzelverbindungen ein gemeinsames Bauschema haben. Es enthält ein hochhydroxyliertes Triterpenderivat (Protoaecigenin und Barringtonenol C), das esterartig am C-21 Angelica-bzw. Tiglinsäure und an C-22 vorwiegend Essigsäure enthält. Über die OH-Gruppe an C-3 ist eine D-Glucuronsäure glykosidisch gebunden, die in Stellung 2 und 4 zwei Moleküle D-Glucose trägt, dabei kann eine D-Glucose teilweise durch D-Xylose oder D-Galaktose ersetzt sein.

Die Untersuchung des Aglykonanteils wurde an dem durch enzymatische Spaltung aus Aescin gewonnenen Protoaecigenin-diester XII durchgeführt, dessen Struktur durch Röntgenstrukturanalyse geklärt worden ist. Durch NMR-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass die Stellung der Säuren auch in den genuinen Saponinen der Pflanze vorliegt.

Ferner wurde durch vergleichende NMR-Spektroskopie mit Protoaecigenin die 21 β ,22 α -Diol-Gruppierung von Theasapogenol A und E, Camelliagenin D und Barrigenol R₁, sowie die 22 α -Hydroxygruppe in Dihydro-priverogenin A, Camelliagenin B und C und Barrigenol A₁ gesichert.

Abstract—The crystalline main saponin "Aescin" from the seeds of *Aesculus hippocastanum L.* is a complex mixture, the individual components of which have the same basic principle. A highly hydroxylated triterpene derivative is present (protoaecigenin and barringtonenol C) in which angelic/tiglic acid and acetic acid are bound as esters at C-21 and C-22. The OH group at C-3 is linked to D-glucuronic acid with two molecules of D-glucose at positions 2 and 4, one D-glucose being partially convertible to D-xylose or D-galactose.

The structure of the aglycone was based on protoaecigenindiester XII (of known structure) obtained by the enzymatic cleavage of "Aescin". It was proved by NMR spectroscopy that the assigned positions of the acids are also correct for the true saponins of the plant.

Further, by comparative NMR spectroscopy with protoaecigenin the 21 β ,22 α -diol groupings of theasapogenol A and E, camelliagenin D and barrigenol R₁, and the 22 α -OH group in dihydropriverogenin A, camelliagenin B and C and barrigenol A₁, have been ascertained.

VOR kurzem haben wir über die Isolierung des Hauptglykons aus dem Saponin der Rosskastanien und dessen Strukturermittlung durch Röntgenstrukturanalyse berichtet.² Nachfolgend soll über den Aufbau der vorliegenden Glykoside und im Zusammenhang damit auch über die Struktur der Aglykone von Saponinen mit ähnlichem chemischen Bau berichtet werden.

Die Samen von *Aesculus hippocastanum L.* enthalten ein ausserordentlich komplexes Saponingemisch, aus dem man leicht eine kristallisierte Substanz "Aescin" gewinnen kann. Auch dieses gut kristallisierende Material, das sich chromatographisch sehr schwer und nur unvollkommen auftrennen lässt und einen scharfen Schmelzpunkt von 230·5–232° hat, besteht, wie gezeigt werden wird, noch aus vermutlich mehr als 30 verschiedenen Verbindungen. Dadurch erklärt sich, dass trotz

zahlreicher Untersuchungen die Struktur des "Aescins" bis heute nicht vollständig bestimmt werden konnte.

Da eine vollständige Auftrennung selbst durch die Kombination verschiedenster chromatographischer Techniken nicht erreicht und wohl auch bei der Komplexität kaum erwartet werden kann, war es nötig, die Strukturermittlung am Gemisch selbst durchzuführen. Durch Spaltungsreaktionen konnten trennbare Teilstücke erhalten werden, nach deren Strukturermittlung auf den Aufbau der in der Pflanze vorliegenden Glykoside rückgeschlossen werden musste. Erschwert wurde die Untersuchung noch durch die leichte Umwandelbarkeit der auftretenden Verbindungen, die besonders schonende Methoden der Strukturermittlung erforderten.

Diese Art der statistischen Strukturermittlung war möglich, da, wie wir fanden, allen im "Aescin" vorhandenen Verbindungen ein gemeinsames Bauprinzip zu Grunde liegt. Ein hochhydroxyliertes Triterpenderivat (Protoaescigenin und Barringtonenol C) trägt über das OH am C-3 eine Zuckerkette aus D-Glucuronsäure, die ihrerseits am C-2 und C-4 durch 2 Moleküle Zucker (D-Glucose, D-Xylose oder D-Galaktose) verzweigt ist. Am OH an C-21 des Aglykons befindet sich verestert eine ungesättigte (Angelicasäure bzw. Tiglinsäure) und am OH an C-22 eine gesättigte Säure (vor allem Essigsäure).

Die acylfreien Aglykone

Das in den Rosskastanien zu etwa 3–6% enthaltene Saponingemisch haben wir durch schonende Extraktion mit Isopropanol unter enzymhemmenden Bedingungen und anschliessende Sephadexfiltration gewonnen. Das so erhaltene gut wasserlösliche Saponingemisch ("Gesamtsaponin") liegt als Salz vor und wurde in dieser Form für die weiteren Versuche verwendet. Weiterhin gingen wir bei unseren Versuchen von dem zu etwa 2% aus Rosskastanien gewinnbaren kristallisierten "Aescin" aus.³

Frühere Bearbeiter hattenzunächst die acylfreien Aglykone der Rosskastanien-saponine untersucht, die man üblicherweise durch saure und anschliessende alkalische (zur Abspaltung der Estergruppen) Hydrolyse gewinnt. Auf diese Weise war im Arbeitskreis von Ruzicka (bei saurer Hydrolyse 72 Std. Erhitzen mit 0·3 n HCl in Äthanol/Wasser) ein Aglykon gefunden worden, das Aescigenin genannt wurde und die Struktur eines Δ^{12} -Oleanen- $3\beta,22\beta,24,28$ -tetraol- $16\alpha,21\alpha$ -oxids besitzen sollte.^{4, 5} Es war von den Autoren offengelassen worden, ob diese Verbindung selbst als Aglykon vorlag oder erst aus einem Hexahydroxy-triterpen durch Wasserabspaltung entstanden war.

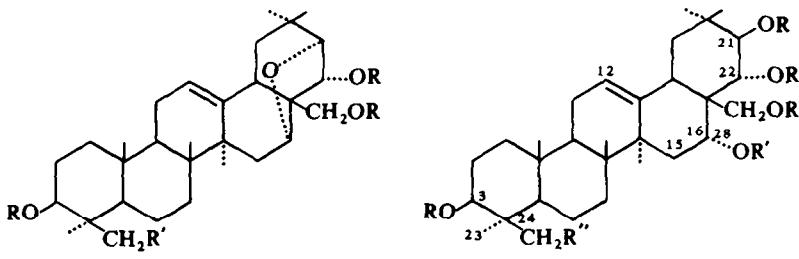
Kuhn und Löw⁶ fanden dann bei schonender saurer Hydrolyse (2 Std. Erhitzen mit 2 n HCl in Äthanol/Wasser) dieses vermutete Hexahydroxy-triterpen als Hauptaglykon, das sie als Protoaescigenin bezeichneten. Außerdem isolierten sie eine Pentahydroxyverbindung, Aescinidin genannt,⁷ die, wie wir zeigen konnten,⁸ mit dem schon bekannten Barringtonenol C⁹ identisch war. Protoaescigenin und Barringtonenol C waren bei der Strukturbestimmung mit dem Aescigenin verknüpft worden und sollten eine $21\alpha,22\beta$ -Diolgruppierung enthalten.

Neben dem Protoaescigenin und dem Barringtonenol C entstehen bei schonender saurer Hydrolyse stets die zugehörigen Wasserabspaltungsprodukte (Aescigenin bzw. Barringtonenol D), so dass offenblieb, ob diese als Aglykone in den Glykosiden der Rosskastanie z.T. selbst vorkommen.

Es gelang nun mit Hilfe eines Enzymgemisches aus der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*), im wesentlichen β -Glucuronidase, Sulfatase, β -Glucosidase, β -Galaktosidase und andere Glykosidasen enthaltend,¹⁰ die Zucker im neutralen Milieu schonend abzuspalten. Nach anschliessender alkalischer Hydrolyse erhielt man aus "Aescin" nur noch Protoaecigenin und etwa 20% Barringtonol C, aber kein Aescigenin und Barringtonol D mehr, womit endgültig bewiesen ist, dass diese Verbindungen im Aescin nicht vorliegen. Die gleiche Methodik auf das "Gesamtsaponin" angewandt, ergab neben Protoaecigenin und Barringtonol C noch zwei weitere Aglykone A₃ und A₄ in geringer Menge, die nicht näher untersucht wurden.

Durch Spaltung mit Bodenbakterien hatte Yosioka¹¹ aus dem Saponin von *Aesculus turbinata* Blume ebenfalls Aglykone erhalten. Dabei werden allerdings die Säuren gleichfalls abgespalten und Veränderungen am Aglykon sind nicht auszuschliessen. Er fand Protoaecigenin, Barringtonol C und in sehr geringer Menge 16-Desoxy-barringtonol C. Aufgrund NMR-spektroskopischer Untersuchungen ist dann die Stellung der OH-Gruppen im Protoaecigenin und Barringtonol C an C-21 und C-22 neu formuliert worden.¹²⁻¹⁴

Die NMR-Spektroskopie (insbesondere der Acetate) hat sich bei der Strukturaufklärung von hochhydroxylierten Triterpenaglykonen sehr bewährt. Da sie auch in der vorliegenden Untersuchung eine wesentliche Rolle spielt, soll näher darauf eingegangen werden.



- I: R = H; R' = OH Aescigenin
 II: R = H; R' = H Barringtonol D
 X: R = Ac; R' = OAc
 XI: R = Ac; R' = H

- III: R = R' = H; R'' = OH Protoaecigenin
 IV: R = R' = R'' = H Barringtonol C
 V: R = R' = Ac; R'' = OAc
 VI: R = R' = Ac; R'' = H
 VII: R = Bz; R' = H; R'' = OBz
 VIII: R = Bz; R' = R'' = H
 IX: R = Ac; R' = H; R'' = OAc

Protoaecigenin-hexaacetat (V) zeigt im Bereich von 4–7 τ neben dem olefinischen Proton an C-12 die Protonen in der Nachbarschaft zu —OAc Gruppen: 1 H an C-3, 1 H an C-16, 2 H an C-21 und C-22, 2 H an C-24 und 2 H an C-28 (Werte siehe Tabelle 1). Dabei überlagern die Signale der Protonen von C-12, C-16, C-21 und C-22 einander, so dass sie etwas schwierig zuzuordnen sind. Es ist aber deutlich ersichtlich, dass die beiden H an C-21 und C-22 infolge gleicher chemischer Verschiebung ein einziges scharfes Singulett ergeben, aus dem Kopplungskonstanten nicht ermittelt werden können. Mit Ausnahme der beiden H am C-24 zeigt Barringtonol C-pentaacetat (VI) das gleiche Spektrum. Die Protonen an C-21 und C-22 werden aber dann ungleichwertig, wenn man von Protoaecigenin-hexaacetat zum Pentaacetat (IX) und vom Barringtonol C-pentaacetat zum -tetraacetat (OH-Gruppe an C-16 nicht acetyliert) übergeht. Die Signale der beiden Protonen von C-21 und C-22

TABELLE I. NMR-SIGNALE VON TRITERPENDERIVATEN ZWISCHEN 3·5-7 τ

Substanz	12-H	21α-H	22β-H	16β-H	3α-H	24-H	28-H
V	~4.52 (br. S)	4.60 (S)	4.60 (S)	~4.64 (br. S)	5.40 (T, 7)	5.59 (D; 12.5) 5.81 (D; 12.5)	6.20 (br. S)
VI	~4.52 (br. S)	4.61 (S)	4.61 (S)	~4.65 (br. S)	5.50 (T, 7)	./.	6.19 (br. S)
VII	4.55 (br. S)	3.80 (D; 10) 3.99 (D; 10)	~5.43	5.12 (Q, 7.9)	5.28 (D; 12) 5.53 (D; 12)	5.88 (D; 12) 5.98 (D; 12)	
VIII	4.52 (br. S)	3.78 (D; 10) 3.96 (D; 10)	5.38 (br. S)	5.20 (Q, 7.9)	./.	5.86 (D; 12) 5.96 (D; 12)	
IX ¹³	4.62	4.46 (D; 10) 4.59 (D; 10)	~5.80	5.40 (T, 7)	5.65 (D; 12) 5.86 (D; 12)	6.34 (br. S)	
X	4.64	6.37 (S)	4.64 (S)	5.70 (T, 7)	5.35 5.82 (D; 12)	5.86 (D; 11.5) 6.13 (D; 11.5)	
XI	4.66	6.39 (S)	4.66 (S)	5.71 (T, 7)	5.46 ./.	5.88 (D; 11.5) 6.15 (D; 11.5)	

NMR-Spektren in CDCl₃ bei 60 MHz mit TMS als innerem Standard = 10 τ.

S = Singulett, D = Dublett, T = Triplett, Q = Quartett, br. S = breites Singulett.

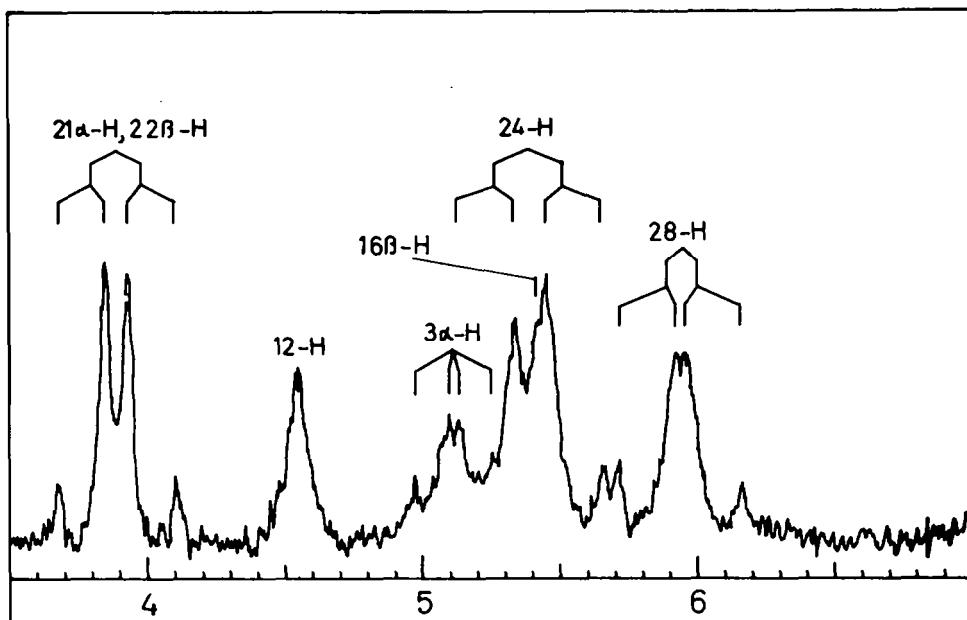
bilden jetzt ein AB-Spektrum mit einer Differenz der chemischen Verschiebung von 0.13 τ und einer Kopplungskonstanten von 10 c/s. Auch hier tritt Überlagerung der Signale auf.

Wesentlich günstiger zur Untersuchung der Stereochemie sind das Pentabenoat VII bzw. das Tetrabenoat VIII, bei denen, wie Abbildung 1 zeigt, fast keine Überlagerungen auftreten und die Struktur der Signale klar erkennbar wird. Auch hier ergibt sich für die Kopplungskonstante der beiden H von C-21 und 22 etwa 10 c/s.

Es ist von verschiedenen Seiten¹²⁻¹⁴ darauf hingewiesen worden, dass diese Kopplungskonstanten nicht mit einer diäquatorialen Anordnung der beiden vicinalen H am C-21 und C-22, wie sie bei einer 21-α-OH und 22-β-OH-Gruppe vorliegen, zu vereinbaren sind. Protoaecigenin sollte demnach zwei transdiaziale H im Ring E und ein 21-β- und ein 22-α-Hydroxyl besitzen. Yosioka¹⁵ hatte aber bereits erklärt, dass diese Folgerung nur dann zutrifft, wenn Ring E sich in Sesselkonformation befindet: bei einer Bootform dagegen würden diese Koppelkonstanten für eine 21α-OH, 22β-OH-Gruppierung sprechen.

Im Aescigenin-tetraacetat X (und analog im Barringtonol D-triacetat XI) ist durch die Ätherringbildung von C-21 nach C-16 die Konformation des Ringes E stärker fixiert. Bei der wahrscheinlichsten Konformation ergibt sich am Dreidingmodell ein Winkel für 21β-H mit 22α-H von ~30° und von 21β-H mit 22β-H von ~90°. Da im Aescigenin je ein Singulett für das 21- und das 22-H auftritt, muss man annehmen,¹²⁻¹⁴ dass das 22-H β-konfiguriert ist.

Diese Ergebnisse stützen sich jedoch nur auf NMR-Spektren und auch die weiteren Untersuchungen an Derivaten (vor allem an Acetoniden) sind im wesentlichen in gleicher Weise durchgeführt worden. Es erschien daher unumgänglich, unabhängige Beweise für die Stellung der OH-Gruppen an C-21 und C-22 zu finden und die Konformation der Ringe D und E zu klären. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Hoppe, München, wurde daher eine Leichtatomröntgenstruktur-

ABB. 1 NMR-Spektrum des Protoaecigenin-pentabenoats (VII) bei 60 MHz in CDCl_3

analyse an dem auch für die Stellung der Säuren wichtigen Protoaecigenin-diester XII durchgeführt.² Dabei ergab sich, dass im Protoaecigenin der Ring E in einer echten Sesselkonformation vorliegt und die OH-Gruppen an C-21 und C-22 *trans*-diäquatorial (21β -OH, 22α -OH) angeordnet sind, dass also die durch NMR-Analyse aufgestellte Struktur III korrekt ist. Ferner bietet diese Röntgenstrukturanalyse eine Bestätigung der Natur des vorliegenden Ringsystems und der Stellung der übrigen OH-Gruppen.

Interessant ist ferner die Konformation des β -Amyrin-ringsystems, die nicht mit der an Dreidingmodellen zu beobachtenden übereinstimmt.^{2, 16} Die Ringe A, B und C weisen durch die Abstossung der axialen Gruppen C-24, 25 und 26 ein Verzerrung der in Sesselform *trans*-verknüpften Ringe auf. Am stärksten tritt die Abweichung von Modell in den Ringen D und E zutage. Ring D ist durch die sp^2 -Hybridisierung an C-13 und durch die gegenseitige Abstossung der axialen Substituenten an C-14 und C-16 sowie durch das axial stehende C-19 abgeflacht, wobei nur das C-Atom-16 nach unten aus der Ebene heraussteht. Dadurch wird das *cis*-Dekalinsystem D/E abgeflacht und Ring E, der in den Modellen nach unten abgeknickt erscheint, liegt fast in einer Ebene mit dem übrigen *trans*-verknüpften Ringsystem. Der Ring E ist nicht verzerrt und liegt in normaler Sesselform vor, die Abflachung kommt nur durch eine Konformationsänderung der Ringe C und D zustande.

Durch diese Strukturaufklärung des Protoaecigenins ist es nun möglich, den Aufbau einer ganzen Reihe hochhydroxylierter β -Amyrinderivate in Bezug auf die Konfiguration an C-21 und C-22 abzusichern. Alle genannten Verbindungen sind mit dem Protoaecigenin direkt durch chemische Beziehungen verknüpft oder durch vergleichende NMR-Spektroskopie korreliert.

Das Barringtonenol C⁹ (früher auch als Aescinidin,^{7,8} Jegosapogenol¹⁷ und Theasapogenol B¹⁵ bezeichnet) zeigt im NMR-Spektrum seiner Derivate (siehe Tabelle 1) mit Ausnahme der Methylengruppe C-24 vollständige Identität mit den entsprechenden Derivaten des Protoaescigenins, besitzt also insbesondere in den Ringen D und E auch die analoge Struktur IV.

Die durch Säure katalysierte Wasserabspaltung von Protoaescigenin zu Aescigenin und von Barringtonenol C zu Barringtonenol D tritt offenbar unter Konfigurationsumkehr am C-21 ein. Die Struktur dieser beiden Verbindungen I und II ist jetzt durch die Korrelierung mit Protoaescigenin gesichert.

In den letzten Jahren sind von mehreren, insbesondere japanischen, Arbeitskreisen eine ganze Reihe weiterer mit dem Protoaescigenin verwandter Aglykone beschrieben worden. Es sind dies Theasapogenol A¹⁸ und E,¹⁹ Camelliagenin B,^{20,21} C^{20,21} und D,²² Dihydropriverogenin A²³⁻²⁶ sowie Barrigenol R₁^{27,28} und Barrigenol A₁.^{27,28} Davon sollen Theasapogenol A (XIII) und E (XIV), Camelliagenin D (XV) und Barrigenol R₁ (XVI) ebenfalls eine 16α,21β,22α,28-Tetraol-Gruppierung besitzen. Nach dem NMR-Spektrum hat diese die gleiche Konfiguration wie im Protoaescigenin (siehe Tabelle 2). (Camelliagenin D ist durch Reduktion direkt in Protoaescigenin übergeführt worden). Damit kann auch für diese Verbindungen die hauptsächlich durch NMR-Spektroskopie ermittelte Struktur im Ring E als gesichert gelten.

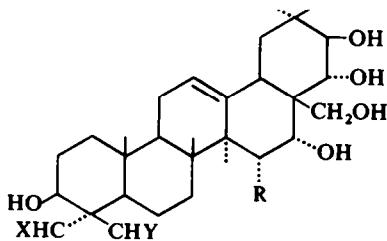
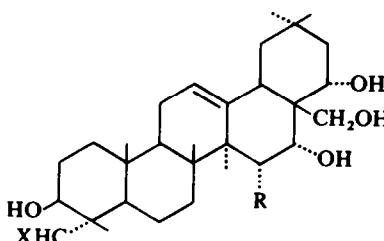
TABELLE 2. NMR-SPEKTREN DER ACETATE MIT FREIER 16-OH-GRUPPE

Substanz	16β-H	21α-H, 22β-H	28-H	Literatur
Protoaescigenin-pentaacetat	~5.80	4.46 (D, 10) 4.59 (D, 10)	6.34 (br. S)	22
Theasapogenol-A-pentaacetat	5.81	4.48 (D, 10) 4.59 (D, 10)	6.33 (br. S)	18
Theasapogenol E-tetraacetat	5.80	4.45 (D, 10) 4.58 (D, 10)	6.33 (br. S)	22
Barrigenol R ₁ -pentaacetat	5.84 (D, 4)	4.36 (D, 10) 4.67 (D, 10)	6.08 (D, 12) 6.30 (D, 12)	28

Dem Dihydropriverogenin A (XVII) und den Camelliageninen C (XVIII) und B (XIX) sowie dem Barrigenol A₁ (XX) fehlt die 21-OH-Gruppe. Das H am C-22 bildet jetzt den X-Teil eines ABX-Spektrums und tritt als Quartett auf mit den Koppelkonstanten 7 und 11 c/s. Unter Voraussetzung der jetzt für diesen Verbindungstyp bewiesenen Sesselkonformation des Ringes E ist dieser Befund nur mit einem 22β-H zu vereinbaren, so dass damit auch die Konfiguration der anfangs falsch zugeordneten²³ 22-OH-Gruppe endgültig gesichert ist.

Die Stellung der Säuren

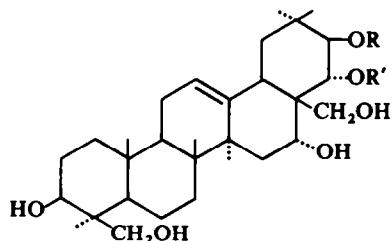
Bei der alkalischen Spaltung von "Aescin" erhält man 2 Moleküle Säure und ein esterfreies Glykosid, Aescinol genannt.²⁹ Als Säuren wurden zunächst Essigsäure und Tiglinsäure aufgefunden, wobei letztere bei der alkalischen Spaltung aus α-Methyl-β-hydroxybuttersäure durch Wasserabspaltung hervorgegangen sein sollte.²⁹⁻³¹ Kuhn und Löw⁶ fanden jedoch bei einer genauen Analyse des Säureanteils

XIII: R = H, Y = H₂, X = H, OH Theasapogenol AXIV: R = H, Y = H₂, X = O Theasapogenol E
(CamelliageninE)XV: R = H, Y = O, X = H₂ Camelliagenin DXVI: R = OH, Y = H₂, X = H₂ Barrigenol R₁XVII: R = H, X = H₂ Dihydropriverogenin A
(Camelliagenin A)

(Theasapogenol D)

XVIII: R = H, X = H, OH Camelliagenin C

XIX: R = H, X = O Camelliagenin B

XX: R = OH, X = H₂ Barrigenol A₁

XII: Protoaecigenin-diester

R = Rest von Angelica-/Tiglinsäure

R' = vorwiegend Rest von Essigsäure

mit Hilfe der Gaschromatographie ein Mol gesättigte Säuren (vor allem Essigsäure neben Isobuttersäure und α - oder β -Methyl-buttersäure) und ein Mol ungesättigte Säuren (Tiglinsäure und Angelicasäure). Wir identifizierten die Methyl-buttersäure mittels Kapillargaschromatographie des Methylesters als α -Methyl-buttersäure und fanden durch quantitative Auswertung der Gaschromatogramme im Mittel ein Verhältnis von Essigsäure, α -Methyl-buttersäure, Isobuttersäure, Tiglinsäure und Angelicasäure von 8:1:1:6:4, während das nicht kristallisierte Gesamtsaponin die Werte 10:1,5:1:4:3,5 lieferte. Auffallend ist das Auftreten eines Gemisches von Säuren im kristallisierten "Aescin". Es wurde geprüft, ob die in geringerer Menge auftretenden Säuren vielleicht nur in Kastanien bestimmter Herkunft vorhanden sind und ob es vielleicht "chemische" Rassen gibt; doch zeigten die Saponine verschiedener Herkunft sowie die aus Kastanien eines einzigen Baumes stets das gleiche Säureverhältnis.

Es musste nun geklärt werden, an welchen Positionen die Säuren im Saponin angreifen. Dafür kommen sowohl die OH-Gruppen des Genins als auch die der Zuckerkette in Betracht. Zunächst war angenommen worden,³¹ dass eine α -Methyl- β -acetoxybuttersäure als Ester am OH an C-28 des Aglykons vorliegt, diese Ansicht wurde später widerrufen.³² Kuhn und Löw³³ nahmen aufgrund der Untersuchung von durch Säurespaltung erhaltenen Esteraglykonen an, dass Tiglin- und Angelicasäure sich an C-21 und Essigsäure sich an C-16 befinden. Nach Bekanntwerden der sehr leicht verlaufenden Acylwanderungen wurde diese Ansicht in der Weise geändert,³⁴ dass im kristallisierten "Aescin" die ungesättigte Säure am OH an C-22 sitzt und von dort leicht an das Hydroxyl an C-21 wandert und so das sogenannte "Kryptoaescin" (siehe später) entstehen soll.

Wir hatten uns zunächst ebenfalls bemüht, durch Säurespaltung Esteraglykone zu erhalten und in diesen die Anknüpfung der Säuren aufzuklären. Bei unseren Versuchen entstanden jedoch eine ganze Reihe schwer trennbarer Esteraglyka, die nach chromatographischer Reinigung leicht Umwandlungen zeigten, die eine Reindarstellung sehr erschwerten. Es dürfte sich dabei u.a. auch um die schon beschriebenen 21-Tigloyl(Angeloyl)- und 28-Tigloyl(Angeloyl)-protoaecigenine³³ gehandelt haben.

Bei hiervon unabhängigen Versuchen an Acetaten des Dihydroriverogenins A fanden wir eine überraschend leicht verlaufende reversible Acylwanderung über die OH-Gruppe von C-28 nach C-22.²³ Diese Wanderung erfolgte schon beim Erwärmen in Methanol/Wasser, beim Chromatographieren und am schnellsten in saurer oder alkalischer Lösung. Es war daher nicht gesichert, dass man bei saurer Hydrolyse des "Aescins" Esterglyka erhielt, in denen die Stellung der Säure noch genuin war. Dieser Weg wurde daher verlassen.

In der Folgezeit sind eine ganze Reihe von Acylwanderungen an in den Ringen D und E hochhydroxylierten Triterpenen beschrieben worden, so dass dies als eine typische Eigenschaft dieser Verbindungen gelten darf. An Protoaecigeninderivaten wurde eine Wanderung $28 \rightleftharpoons 22\alpha$ und $28 \rightleftharpoons 21\beta$ beobachtet.³⁴ An Dihydroriverogenin A-derivaten stellte man eine Wanderung $16\alpha \rightarrow 28$ fest, die wohl am leichtesten über eine 22α -Zwischenstufe verläuft,²⁴ aber auch, wie kürzlich an Primulagenin A-derivaten gezeigt wurde, direkt und reversibel verlaufen kann.³⁵ Eine weitere Acylwanderung am Dihydroriverogenin A ist von $22\alpha \rightarrow 16\alpha$ bekannt geworden.²⁶

Es wurde daher nach Möglichkeiten gesucht, die Zucker im "Aescin" auf schonende Weise ohne Verwendung von Säure abzuspalten. Der Versuch einer Spaltung mit Perjodat, wie sie beim Senegin angewandt wurde,³⁶ brachte kein befriedigendes Ergebnis. Bei der enzymatischen Spaltung in wässriger Lösung bei pH 6 mit Schneckenenzym jedoch wurden in fast quantitativer Ausbeute aus "Aescin" die genuinen, bisher noch nicht erhaltenen Aglykone gewonnen.² Es handelt sich um die Diester von Barringtonol C und Protoaecigenin, die durch Säulenchromatographie an SiO₂ getrennt wurden. Man erhielt dabei als Hauptprodukt den Protoaecigenin-diester XII chromatographisch einheitlich mit dem Schmelzpunkt 238–247°, $[\alpha]_D^{20} +24.4^\circ$. Bei der alkalischen Hydrolyse lieferte er Protoaecigenin sowie Essigsäure, Isobuttersäure, α -Methylbuttersäure, Angelicasäure und Tiglinsäure im entsprechenden Verhältnis, wie das zur enzymatischen Spaltung eingesetzte "Aescin". Damit war gesichert, dass die vorhandenen Säuren sich nur im Aglykonteil befinden. Es wurde darauf verzichtet, dieses Gemisch unterschiedlicher Ester weiter aufzutrennen. An der Mischung wurde untersucht, ob die Säuren statistisch über zwei oder mehrere OH-Gruppen verteilt sind, oder andererseits die ungesättigten Säuren an einer und die gesättigten an einer anderen OH-Gruppe sich befinden.

Auch aus dem schonend gewonnenen Gesamtsaponin erhielt man durch enzymatische Spaltung als Hauptprodukt den Protoaecigenin-diester XII; es entstanden hier jedoch in geringerer Menge eine Reihe weiterer Stoffe, worunter nach chromatographischem Vergleich sich auch das 21-Tigloyl (angeloyl)-protoaecigenin befand.

Zur Ermittlung der Stellung der Säuren wurden das Silylättherderivat und das Tribenzoat des gewonnenen Protoaecigenin-diesters im NMR vermessen. Dabei wurden die erhaltenen Signale jeweils mit denen des Pentabenzooats und des Penta-silylathers des Protoaecigenins verglichen. Benzoyl- und Silylreste boten sich als Schutzgruppen für diese Untersuchung deswegen an, da die jeweils in Nachbarschaft

zu $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ oder $-\text{O}-\text{CO}\cdot\text{C}_6\text{H}_5$ stehenden Protonen einen verhältnismässig grossen Unterschied in der chemischen Verschiebung zeigen ($1-2 \tau$), und man so leicht die schon vorher in XII vorhanden gewesenen Säuren an der relativen Konstanz in der Lage der Signale ihrer benachbarten Protonen erkennen kann. Die Silylgruppe hat darüber hinaus den Vorteil, dass unterhalb $5-6 \tau$ ausser dem C-12-H überhaupt keine Protonen vorhanden sind. Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, dass in den Diester-derivaten gegenüber den Derivaten des Protoaescigenins ein Singulett entsprechend 2H bei $4-26$ bzw. $4-36 \tau$ neu auftritt. Dieses Signal kann nur von dem C-21- und C-22-H herrühren, deren chemische Verschiebung, und zwar in beiden Verbindungen, offenbar gleich ist. Im freien Protoaescigenin-diester XII ist die chemische Verschiebung nicht gleich und man erhält ein AB-Spektrum mit einer Kopplungskonstanten von 10 c/s .

TABELLE 3. ZUR FESTLEGUNG DER SÄURESTELLUNG BENUTZTE NMR-SIGNALE ZWISCHEN 3-5 τ

Substanz	12-H	21 α -H	22 β -H	H von Angelat	H von Tiglat	
Protoaescigenin-pentabenzooat	4-55	3-80 (D; 10-5) 3-99 (D; 10-5)		./.	./.	
Protoaescigenin-pentasilylätther	4-68	./.		./.	./.	
Protoaescigenin-diester-tribenzooat	4-55	4-26 (S)	4-26 (S)	~3-92	~3-20	
Protoaescigenin-diester-trisilylätther	4-58	4-36 (S)	4-36 (S)	~3-87	~3-12	
Persilylierte Saponine						
Aescin 1 \times krist.	4-69*	4-47 (S)	4-47 (S)	~4-00	~3-10	Schulter bei 4-54
Aescin 4 \times krist.	4-69*	4-45 (S)	4-45 (S)	~3-98	~3-10	kaum eine Schulter bei 4-54
“Gesamtsaponin” 2 \times Sephadex	4-69*	4-50 (S)	4-50 (S)	~3-95	~3-10	starke Schulter bei 4-54
Pressaftsaponin I	4-69*	4-50 (S)	4-50 (S)	‡	‡	sehr schw. Schulter bei 4-54
Pressaftsaponin II	4-69*	4-47 (S)	4-47 (S)	‡	‡	stärkster Peak bei 4-55
Theasaponin 1 \times krist.	4-69*	4-47 (S)	4-47 (S)	~3-89	~3-05	kaum eine Schulter
Theasaponin 6 \times krist.	4-69*	4-49 (S)	4-49 (S)	~4-00	~3-10	keine Schulter bei 4-54
Theasaponin 6 \times krist., bei 90 MHz†	4-69*	4-47 (S)	4-47 (S)	~3-95	~3-10	kleiner Peak bei 4-53

NMR-Spektren in CDCl_3 mit dem Gerät Varian A-60 in Verbindung mit dem TAD-Computer, untersuchter Bereich bei den Saponinen 10-150 mal gespeichert je nach vorliegender Konzentration.

* Das Signal des 12-H wurde bei der Untersuchung der Saponine als interner Standard benutzt und in jedem Falle = $4-69 \tau$ gesetzt.

† Spektrum bei 90 MHz gemessen mit dem Gerät von Spektrospin HX-90.

‡ Konzentration an Saponin zu gering, um das olefinische Proton der Angelicasäure bzw. Tiglinsäure eindeutig zu erkennen.

Damit ist geklärt, dass die Säuren in XII sich an C-21 und C-22 befinden. Ferner kann man aus den Spektren erkennen, dass tatsächlich Tiglin- und Angelicasäure vorhanden sind. Das olefinische Proton des Tiglin- und Angelicasäureesters liegt als komplexes Multiplett bei $3\cdot16 \tau$ bzw. $3\cdot93 \tau$ vor. Die Integration zeigt jedoch, dass mehr Angelicasäure als Tiglinsäure vorhanden sein muss ($\sim 6:4$), dass also offenbar bei der quantitativen Bestimmung durch alkalische Hydrolyse und Gaschromatographie ein Teil der Angelicasäure in die stabilere Tiglinsäure isomerisiert worden ist.

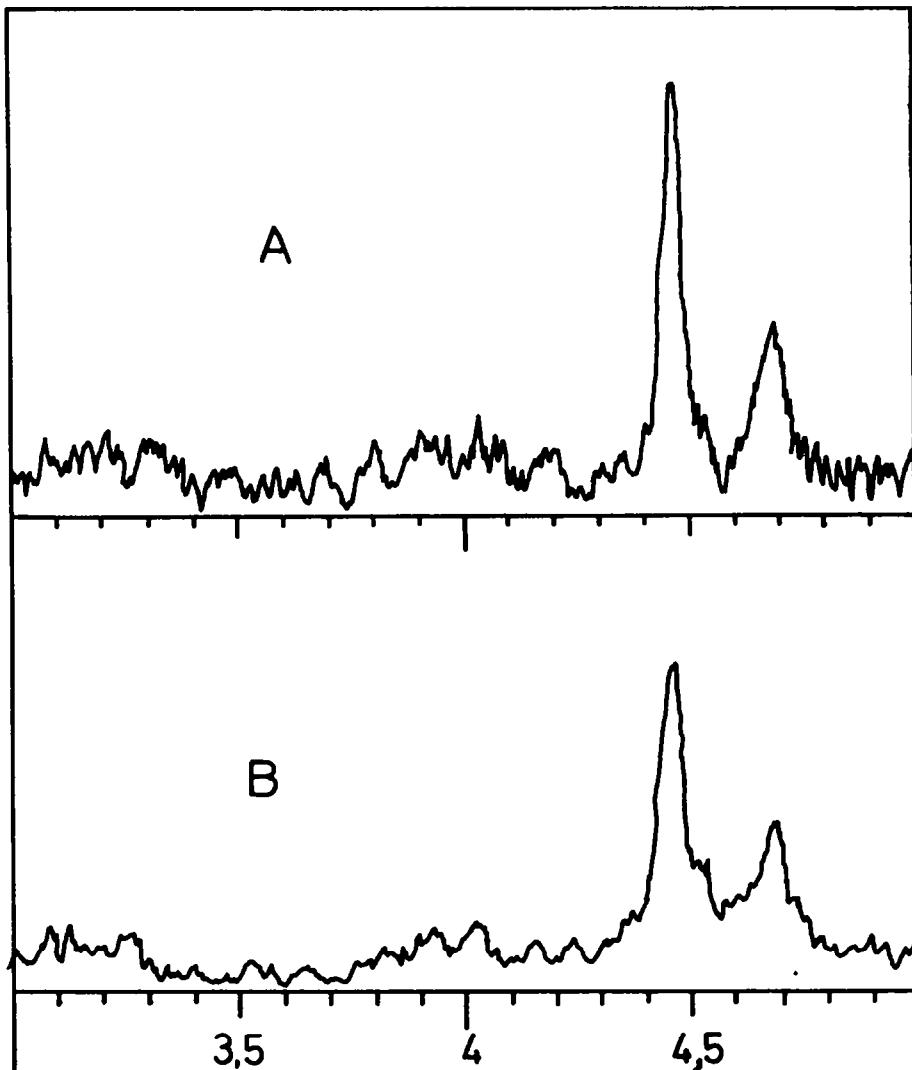
Weiterhin war noch zu klären, an welchem C-Atom sich die einzelnen Säuren befinden. Dazu haben wir versucht, durch vorsichtige saure oder alkalische Hydrolyse die labiler gebundene Essigsäure abzuspalten und danach den verbleibenden Tiglin- bzw. Angelicasäurerest zu lokalisieren. Bei diesen Versuchen zeigte es sich, dass es zwar gelingt, dünnenschichtchromatographisch den intermediär auftretenden Monoangeloyl (tigloyl)-ester nachzuweisen, dass aber kein einheitliches Produkt entsteht, da gleichzeitig vermutlich Acylwanderung eintritt.

Eine einwandfreie Lokalisierung ergab sich durch die Röntgenstrukturanalyse des Protoaecigenin-diesters XII,² die ergab, dass Tiglinsäure bzw. Angelicasäure am C-21 und Essigsäure am C-22 sich befinden. Eine einwandfreie Lokalisierung der α -Methyl-buttersäure und Isobuttersäure gelang auf röntgenographischem Wege wegen der geringen Konzentration der Ester dieser Säuren bis jetzt nicht.

Aus dem Massenspektrum von XII lassen sich jedoch Rückschlüsse wenigstens auf die Stellung der α -Methylbuttersäure ziehen. Neben dem Molekularion $m/e = 630$ für den Hauptbestandteil (Protoaecigenin-21-tiglat(angelat)-22-acetat) trat zu etwa 12% an Intensität hierbei die Masse $m/e = 672$ auf, die einem Protoaecigenin-21-tiglat(angelat)-22- α -methylbutyrat zuzuordnen ist. Eine entsprechende Masse für ein 22-Isobutyrat wurde bisher nicht in ausreichender Intensität gefunden.

Damit ist die Struktur des Protoaecigenin-diesters weitgehend geklärt. Nachzuweisen blieb, ob damit wirklich das wahre Aglykon des "Aescins" vorliegt oder ob z.B. bei der Chromatographie an Kieselgel Veränderungen in der Stellung der Säuren eingetreten waren. Dazu wurde "Aescin" silyliert und im NMR untersucht. Auch hier trat wie im Silyl-protoaescigenin-diester (siehe Tabelle 3 und Abbildung 2) ein Singulett für etwa zwei Protonen bei $4\cdot47 \tau$ auf, daneben fand sich eine Schulter bei $4\cdot57 \tau$, die beim mehrfach umkristallisiertem "Aescin" praktisch verschwunden war. "Aescin" enthält also die gleiche Säureanordnung wie XII; diese muss nach der Integration auch im entsprechenden Barringtogenol C-glykosid vorhanden sein. In Bezug auf die Stellung der Säuren sind demnach alle Glykoside des umkristallisierten "Aescins" einheitlich.

Eine weitere Frage ist, ob diese Struktur auch in den genuinen Glykosiden vorhanden ist, da bei der Isolierung des "Aescins" der Extrakt mit saurem Ionenaustauscher behandelt worden war³ und schon hier eine Acylwanderung denkbar wäre. Dazu wurden frische Kastanien bei hohem Druck ausgepresst und der Extrakt sofort bei -65° eingefroren und gefriergetrocknet. Nach zweimaliger Sephadextrennung, wobei die erhaltenen Fraktionen wiederum gefriergetrocknet wurden, lag ein chromatographisch sich einheitlich verhaltendes Saponin vor, das nach Silylierung wiederum im NMR ein Singulett bei $4\cdot50 \tau$ zeigte. Damit ist gesichert, dass ein erheblicher Teil der genuinen Gesamtglykoside der Kastanie an C-21 und C-22 Acylreste trägt und dass das kristallisierte "Aescin" noch die genuine Säurestellung enthält. Neben der Hauptsubstanz wurde die Sephadextrennung ein nachlaufendes Bei-

ABB. 2 NMR Spektrum bei 60 MHz in CDCl_3 ,

A = Silylierter Protoaescigenin-diester

B = 1 mal umkristall. "Aescin" silyliert

produkt stark angereichert (Pressaftsaponin II), das ein Singulett bei 4.56τ neben einem schwächeren bei 4.47τ zeigte, bei dem also die sonst nur als Schulter vorhandene Bande dominierte. Anhand der bisherigen Daten können über diese Substanz noch keine näheren Angaben gemacht werden.

Die Struktur des Zuckerteils

Als Zuckerbausteine findet man in "Aescin" nach saurer Hydrolyse D-Glucuronsäure, D-Glucose, D-Xylose und D-Galaktose. Nach den Molgewichtsbestimmungen hat man insgesamt 3 Monosaccharideinheiten zu erwarten. Es war zunächst angenommen worden, dass im Hauptglykosid nur D-Glucuronsäure, D-Glucose und

D-Xylose enthalten sind.^{30, 31} Später wurde gefunden,⁶ dass neben 1 Mol D-Glucuronsäure etwa 1·65 Mol D-Glucose und 0·35 Mol D-Xylose + D-Galaktose vorhanden sind. Ausserdem gelang die Isolierung eines säurefreien Aescinols, das nur aus D-Glucuronsäure und zwei Molen D-Glucose aufgebaut ist.⁶ Wagner und Hoffmann³⁷ gelang es, eine gewisse Auf trennung des kristallinen "Aescins" zu erreichen. Sie isolierten die galaktosehaltigen Glykoside in einer in Bezug auf Aglykon und Zuckerkette einheitlichen Form. Eine Auf trennung des xylosehaltigen und des nur Glucose enthaltenden Glykosids gelang nicht. Alle diese Fraktionen enthalten nach ihren Angaben noch das übliche Säuregemisch, wie es im "Aescin" vorliegt.

Für den Zuckerteil des xylosehaltigen Aescinglykosids nehmen Tschesche, Axen und Snatzke³¹ eine 2(β-D-Xylopyranosido)-4-(β-D-glucopyranosido)β-D-glucuronopyranosido-Struktur an.

Wir fanden in Übereinstimmung mit Kuhn und Löw⁶ für das von uns benutzte kristallisierte "Aescin" ein Zuckerverhältnis von D-Glucuronsäure, D-Glucose, D-Xylose und D-Galaktose von 1·00:1·58:0·23:0·19. Die Methylierung des an der Carboxylgruppe der Uronsäure zu —CH₂OH reduzierten "Aescins" nach Kuhn *et al.*³⁸ lieferte durch saure Spaltung ein Gemisch von Methylzuckern, aus dem die vorhandene Dimethylglucose durch Chromatographie an SiO₂ rein isoliert und kristallisiert erhalten wurde. Sie erwies sich durch direkten Vergleich als identisch mit einer synthetisch dargestellten³⁹ 3,6-Dimethyl-D-glucose. Diese Dimethylglucose stammt aus der reduzierten D-Glucuronsäure, da sie ohne vorherige Reduktion des "Aescins" nicht entsteht. Weitere Dimethylglucosen konnten nicht aufgefunden werden. Es fanden sich weiterhin nur permethylierte Monosaccharide und zwar 2,3,4,6-Tetramethyl-glucose, 2,3,4-Trimethyl-xylose und 2,3,4,6-Tetramethylgalaktose, die durch Gas-, Papier- und Dünnschichtchromatographie eindeutig identifiziert wurden. Das bedeutet, dass in allen im "Aescin" vorhandenen Glykosiden die D-Glucuronsäure in 2- und 4-Stellung durch die Anknüpfung von Glucose, Xylose oder Galaktose substituiert ist. Dabei kommt im "Aescin" zu etwa 60% eine Zuckerkette vor, die je eine Glucose in Position 2 und 4 der Glucuronsäure enthält und zu etwa je 20% ein Analogon, das Glucose und Xylose bzw. Glucose und Galaktose an der Glucuronsäure in 2 und 4 enthält. Dabei gibt es nach den bisherigen Ergebnissen keine Zuckerkette, die Glucuronsäure, Xylose und Galaktose enthält, da wir auf der Stufe des Aescinols die xylosehaltigen Glykoside von den galaktosehaltigen durch Kristallisation trennen konnten; auch die Ergebnisse von Wagner und Hoffmann³⁷ sprechen für eine solche Annahme. Über den Anknüpfungspunkt der Xylose bzw. der Galaktose an der Glucuronsäure in den Nebenglykosiden können wir aufgrund unserer Versuche noch keine Entscheidung treffen.

Die leichte Spaltbarkeit der glykosidischen Bindungen mit einem Enzympräparat, das im wesentlichen β-Glykosidasen enthält,¹⁰ spricht dafür, dass die Zucker β-glykosidisch verknüpft sind. Die Hauptkette besitzt demnach die Struktur eines 2(β-D-Glucopyranosido)-4-(β-D-glucopyranosido)β-D-glucuronopyranosids). Als Anknüpfungspunkt mit dem Aglykon kommt aufgrund der typischen Saponineigenschaften des Aescins nur eine funktionelle Gruppe im Ring A in Frage. Hierbei dürfte es sich um die 3β-OH-Gruppe handeln, die beiden Aglykonen gemeinsam ist.

Das Bauprinzip des "Aescins" und verwandter Glykoside

Aus den bisherigen Erörterungen ergibt sich, dass der Hauptbestandteil des kristallisierten "Aescins", die in Abb. 3 gezeigte Struktur besitzt.

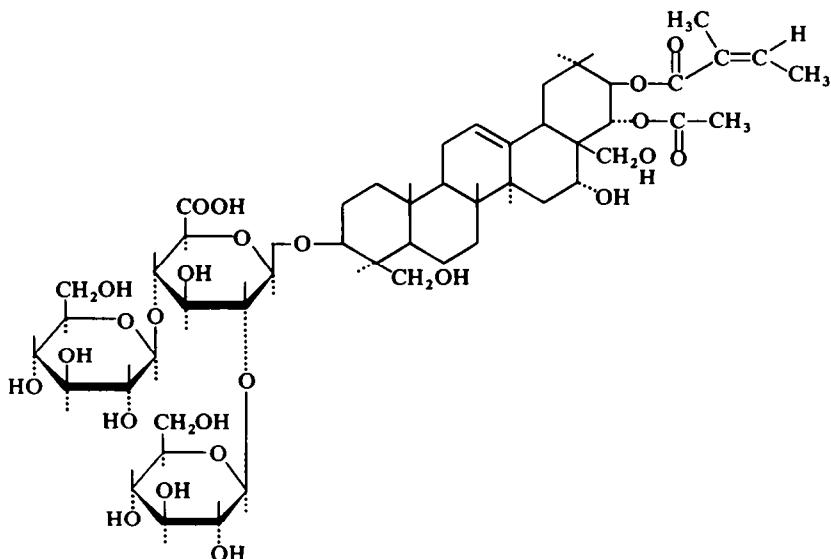


ABB. 3 Hauptglykosid des "Aescins"

Berücksichtigt man, dass im "Aescin" 2 Aglykone, Protoaescigenin und Barringtonogenol C und drei verschiedene Zuckerketten vorliegen, so ergeben sich insgesamt 6 verschiedene Aescinole. Da nach den Untersuchungen von Wagner und Hoffmann³⁷ zu erwarten ist, dass alle 6 Typen das gleiche im "Aescin" vorhandene Säremuster enthalten, darf man annehmen, dass im kristallisierten Aescin mehr als 30 verschiedene chemische Einzelindividuen vorhanden sind. Dabei sollten die 8 häufigsten den in der Tabelle 4 angegebenen Aufbau besitzen und zusammen bereits 73% der Gesamtmenge ausmachen.

Die Zusammensetzung des sogenannten "Gesamtsaponins" dürfte wesentlich komplexer sein, da zusätzlich D-Arabinose und weitere Aglykone auftreten, in dem

TABELLE 4. DIE ZUSAMMENSEZUNG DER IM "AESGIN" VORHANDENEN HAUPTSUBSTANZEN

Triterpenanteil	Zucker	Säuren	%-Gehalt im Aescin
Protoaescigenin	D-Glur; D-Gluc; D-Gluc	Angelica- und Essigsäure	23%
Protoaescigenin	D-Glur; D-Gluc; D-Gluc	Tiglin- und Essigsäure	15%
Protoaescigenin	D-Glur; D-Gluc; D-Xyl	Angelica- und Essigsäure	9%
Protoaescigenin	D-Glur; D-Gluc; D-Xyl	Tiglin- und Essigsäure	6%
Protoaescigenin	D-Glur; D-Gluc; D-Gal	Angelica- und Essigsäure	7%
Protoaescigenin	D-Glur; D-Gluc; D-Gal	Tiglin- und Essigsäure	5%
Barringtogenol C	D-Glur; D-Gluc; D-Gluc	Angelica- und Essigsäure	5%
Barringtogenol C	D-Glur; D-Gluc; D-Gluc	Tiglin- und Essigsäure	3%

Die Prozentgehalte wurden geschätzt. D-Glur = D-Glucuronsäure.

D-Gluc = D-Glucose.

D-Xyl = D-Xylose.

D-Gal = D-Galaktose.

Gemisch auch Monoesterglykoside vorliegen und u.U. z.T. auch ein etwas anderes Bauprinzip verwirklicht sein kann. Ob es sich dem Pressaftaponin II um das früher beschriebene "Kryptoaescin"⁴⁰ handelt, bleibt zu klären. Vom "Aescin" sind zwei Formen, eine wasserlösliche, α -Aescin, und eine wasserunlösliche, β -Aescin, beschrieben worden,³⁰ wobei sich β -Aescin in α -Aescin umlagern lassen soll. Während unserer Versuche haben wir keine chemische Umlagerung von β -Aescin beobachtet; die von uns benutzten kristallinen Produkte waren in Wasser stets schwer löslich.

Die Glykoside des kristallisierten "Aescins" weisen alle ein gemeinsames Bauprinzip auf, in dem lediglich einzelne Bestandteile durch andere ersetzt sein können. Insgesamt bedeutet diese Struktur einen neuartigen Saponintyp. Dabei stellt das Auftreten einer komplexen Mischung sehr ähnlicher Glykoside eine Besonderheit dar, wie sie in dieser Form unseres Wissens bisher nicht aufgefunden wurde. Substanzen eines allgemeineren Bauprinzips (hochhydroxyliertes Triterpen, 2 Mol Säuren an C-21 und C-22 esterartig angeknüpft, eine Glucuronsäure über die OH-Gruppe an C-3 gebunden, die weitere Zuckerbausteine tragen kann) scheinen in der Natur weiter verbreitet zu sein. So haben wir vor kurzem das aus *Thea sinensis* L. isolierte kristallisierte "Theasaponin" in der Struktur geklärt.¹ Auch hier ist eine komplexe Mischung sehr ähnlicher Glykoside vorhanden, die sich aber durch vielfache Umkristallisation in Bezug auf die Zuckerkette und z.T. auf die Säure-zusammensetzung (Isobuttersäure- und α -Methylbuttersäure-ester werden durch die Kristallisation entfernt) einheitlich gewinnen lässt. Als Hauptglykone sind Theasapogenol A und E sowie Barringtonogenol C vorhanden. Die Stellung der Säuren, Angelicasäure, Tiglinsäure und Essigsäure ist jetzt mit der beim "Aescin" beschriebenen Methodik ebenfalls festgelegt worden. Das persilylierte "Theasaponin" zeigt im NMR das typische Singulett bei 4.47 τ (siehe Tabelle 3), das für die Säurestellung im Aescin und im Protoaecigenin-diester XII typisch ist. Damit ist auch im Theasaponin die Angelica(Tiglin)säure an C-21 und die Essigsäure an C-22 gebunden. Aescin und Theasaponin stellen so die ersten in ihrer Struktur aufgeklärten Estersaponine dar.

Theasaponin zeigt sehr ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie das "Aescin",^{1,41} das in kristallisierter Form und als Bestandteil von Extraktten vor allem in den letzten Jahrzehnten in steigendem Masse pharmazeutisch angewandt wird. Dieser Strukturtyp dürfte oedemhemmende, kapillarresistenzsteigernde und die Gefäßpermabilität regulierende Eigenschaften besitzen.

Aus *Gymnema sylvestre* R. Br. wurde das antisaccharine Prinzip, Gymnemasäure^{42,43} isoliert, das aus einem Hexahydroxy-oleanen, den esterartig gebundenen Säuren Tiglinsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Isobuttersäure und α -Methylbuttersäure sowie dem Zuckerbaustein D-Glucuronsäure aufgebaut ist. Man darf vermuten, dass die Gymnemagensäure ähnlich dem hier beschriebenen Typus gebaut ist.

Auch die Saponine aus *Aesculus turbinata* Blume könnten nach den bisherigen Angaben der Literatur^{11,44} dem "Aescin" ähneln. Aus dem Jegosaponin, isoliert aus *Styrax japonica* Sieb. et Zucc.⁴⁵ wurde durch saure Hydrolyse 21-Tigloyl-barringtonogenol C isoliert. Jegosaponin enthält ausserdem 2 Moleküle Glucose, 1 Molekül Rhamnose und 1 Molekül Glucuronsäure und es wäre möglich, dass es ausserdem noch ein Mol von (bisher nicht gefundenen) gesättigten Säuren enthält und so dem hier beschriebenen Saponintyp angehört.

Ein 16-Angeloyl-barringtogenol C wurde aus den Früchten von *Barringtonia acutangula* Gaertn. nach Säurehydrolyse isoliert.⁴⁶ Die Angelicasäure könnte hier

bei der sauren Hydrolyse von C-21 nach C-16 gewandert sein; das Saponin liesse sich dann, wenn man auch hier ein weiteres Mol Säure annimmt, dem neuen Saponintyp zuordnen. Interessant ist, dass aus dem Astholz der gleichen Pflanze nach saurer Hydrolyse ein 21,22-Dibenzoyl-barringtogenol C isoliert wurde.⁴⁷ Bei den zugehörigen Glykosiden dürfte es sich ebenfalls um Vertreter des neuen Saponintyps handeln. Ähnlichkeit mit dem genannten Glykosid scheint ein aus *Styrax officinalis* isoliertes Saponin zu haben, dass ein Aglykon mit 5 Hydroxylgruppen enthält und die Zucker Glucuronsäure, Glucose, Galaktose und Rhamnose besitzt. Am Aglykon finden sich esterartig gebunden zwei Moleküle Benzoesäure.⁴⁸

Anmerkung bei der Korrektur (4.11.68): Während der Drucklegung zu dieser Arbeit erschien eine Kurzmitteilung von J. Wagner, H. Hoffmann und I. Löw (*Tetrahedron Letters* 4387 (1968)), in der die Isolierung der Aglycone des Aescins beschrieben wird. Die Autoren ermittelten für den Protoaescigenin-dicester XII die gleiche Säurestellung, wie sie schon von uns beschrieben wurde²

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Mikroskopheiztisch nach Kofler-Weygand bestimmt. Die Messung der Drehungen erfolgte mit dem Polarimeter 141 von Perkin-Elmer. Die IR-Spektren (in KBr, CCl_4 , Pyridin) wurden mit dem Spektralphotometer Perkin-Elmer. Modell 221 mit Gitterprismenaustauscheinheit, die UV-Spektren mit dem Apparat Cary 14 gemessen. Die NMR-Spektren sind mit dem Varian A-60 (in CDCl_3 mit TMS als internem Standard $\tau = 10$), die Massenspektren mit dem Gerät MS 9 der A.E.I. gemessen worden. Die CH-Analysen führte die Analytische Abteilung unseres Instituts sowie Herr Dr. F. Pascher, Bonn, durch. Zur Säulenchromatographie benutzte man Kieselgel der Gebr. Herrmann, Köln, das auf einheitliche Korngrösse (71–125 μ) gesiebt wurde. Die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Merck) wurde wie üblich durchgeführt,⁴⁹ es wurde mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1:2) oder mit Anilinphthalat in Isobutanol⁵⁰ angefärbt. Zur Papierchromatographie wurde das Papier von Schleicher & Schüll 2043b benutzt. Die Chromatogramme wurden absteigend entwickelt: System A: Essigester/Pyridin/Wasser (3:6:1:1:15);⁵¹ System B: n-Butanol/Wasser/ CCl_4 (4:4:3);⁵² System C: Benzol/Áthanol/Wasser/wässr. NH_3 (25%) (200:47:14:1);⁵³ System D: n-Butanol/Methyläthylketon (1:1), gesättigt mit dem gleichen Volumen Boratpuffer (3-814 g Borax und 0-618 g Borsäure in 200 ml Wasser);⁵⁴ System E: Pyridin/Essigester/Eisessig/Wasser 5:5:1:3 (mobile Phase), auf dem Boden des Chromatographiegefäßes Pyridin/Essigester/Wasser 11:40:6.⁵⁵

Zur quantitativen Zuckerbestimmung bei Anwesenheit von Uronsäure wurde eine neue Bestimmungsmethode ausgearbeitet, bei der die Zucker einmal (a) nach Entfernung der Uronsäure über Ionenaustauscher und einmal (b) nach Reduktion der Uronsäure zur Aldose bestimmt wurden.

(a) Aescin (50 mg) wurde in 6 ml 3 n HCl , 2 ml Dioxan und 6 ml Benzol 4 Std. bei 95° erhitzt. Anschliesend trennte man das Benzol ab und extrahierte die wässr. Phase 2 mal mit Chloroform/Methanol 4:1. Die wässr. Phase wurde anschliessend zur Entfernung der Säure (inklusive der Uronsäure) über eine Säule mit Dow-3 gegeben und anschliessend eingeengt. Nach Silylierung bestimmte man die Zuckermischung gaschromatographisch quantitativ.⁵⁶ Es wurde das Gerät F 7/HF von Perkin-Elmer mit Integrator D2 und Kienzle-Digital-Drucker bei ~30 ml/Min He und Wärmeleitfähigkeitszelle benutzt. Man erhielt mit den angegebenen Korrekturfaktoren⁵⁶ ein molares Verhältnis von D-Glucose/D-Xylose/D-Galactose von 1:58:0:24:0:18, Aescin der Fa. Merck lieferte 1:60:0:18:0:23.

(b) Aescin (50 mg) wurde zur Herstellung des Methylesters in 50 ml Methanol gelöst und mit CH_2N_2 in Äther versetzt, bis die gelbe Farbe einige Zeit bestehen blieb. Nach Einengen der Lösung löste man in 20 ml H_2O , setzte zur Reduktion der Carboxylgruppe 25 mg NaBH_4 hinzu und liess über Nacht stehen. Nach Zerstören des Überschusses an NaBH_4 mit Aceton säuerte man mit H_2SO_4 auf pH 3 an und schüttelte das Reaktionsprodukt 3 mal mit n-Butanol aus. Der eingeengte Butanolextrakt ("Tetrahydroaescin") wurde wie oben angegeben hydrolysiert, die Zucker silyliert und quantitativ gaschromatographisch bestimmt: D-Glucose/D-Xylose/D-Galaktose 2:57:0:23:0:20. Parallelbestimmung 2:58:0:25:0:17.

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Säuren erfolgte nach alkalischer Hydrolyse in 80 proz. Methanol mit 5% KOH während 1 Std. unter Rückfluss. Anschliessend wurde die halbe Menge des Volumens an Wasser zugesetzt und auf ein Viertel eingeengt. Nach Ansäuern mit 4 n H_2SO_4 auf pH 2-3

filtrierte man von einem Niederschlag ab und extrahierte das Filtrat in einem Kutscher-Stedel-Extraktor 6 Std. mit Äther. Die ätherische Lösung trocknete man sorgfältig mit Na_2SO_4 und engte vorsichtig auf ein kleines Volumen ein. Die Säuren wurden gaschromatographisch mit dem Gerät F7/HF von Perkin-Elmer mit Flammenionisationsdetektor untersucht. Mit der Säule "BA" Perkin-Elmer (2 m Stahlsäule, D = 4,65 mm; Füllung: Diäthylhexylsebacinat + Sebacinsäure 20% auf Celite 545) bei 130°, 60 ml/Min N_2 und einer Strömungsteilung nach der Säule 1:4 erhielt man an Retentionszeiten: Essigsäure 10 Min, Propionsäure 18,4 Min, Isobuttersäure 25,8 Min, α -Methylbuttersäure 49,0 Min, Angelicasäure 70,0 Min und Tiglinsäure 100,0 Min.

Zur quantitativen Auswertung wurden die Peakflächen nach Ausschneiden gravimetrisch bestimmt und das relative molare Verhältnis nach Multiplikation mit entsprechenden Responsfaktoren⁵⁷ ermittelt. (Faktoren: Essigsäure 3,50; Isobuttersäure 1,30; α -Methylbuttersäure, Angelicasäure, Tiglinsäure 1,00). Dabei wurde auf eine Summe von 2 Mol Säure bezogen.

Zur Untersuchung der Ester wurde ein Teil der eingegangten Lösung der Säuren mit frischer ätherischer Diazomethan-Lösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Diese Lösung benutzte man direkt zur Gaschromatographie. Getrennt wurde an einer 2 m Stahlsäule, gefüllt mit Polypropylen glykol 15% auf Celite 545, bei 90°. Zur Identifizierung der α -Methylbuttersäure trennte man bei 50° an einer 50 m langen Kapillarsäule gefüllt mit Polypropylen glykol. Bei 2,0 ml/Min N_2 war die Retentionszeit für Isovaleriansäuremethylester 14,7 Min, α -Methylbuttersäure-methylester 13,7 Min und n-Valeriansäure-methylester 21,7 Min.

Ausgangssubstanzen

Aescin der Fa. Madaus & Co. zeigte einen Schmp. 226–227°, $[\alpha]_D^{20} + 25,6^\circ$ ($c = 1,0$, Äthanol).

Die quantitative Zuckerbestimmung ergab im Mittel ein Verhältnis von D-Glucuronsäure/D-Glucose/D-Xylose/D-Galaktose 1,00:1,58:0,23:0,19. Die Bestimmung der flüchtigen Säuren ergab etwa ein Verhältnis von Essigsäure/Isobuttersäure/ α -Methylbuttersäure/Angelicasäure/Tiglinsäure 8:1:1,4:6. Nimmt man dieses Säureverhältnis an und berücksichtigt je 20% Barringtonol C anstelle von Protoaecigenin und 20% D-Xylose anstelle von D-Glucose, so ergibt sich für die Aescinmischung eine mittlere CH-Zusammensetzung von $C_{55,3}H_{86,6}O_{23,6}$ (1129,4). Für diesen Wert werden auch befriedigende CH-Analysen erhalten. CH-Analyse nach Trocknen bei 90° im Hochvakuum. ($C_{55,3}H_{86,6}O_{23,6} \cdot SH_2O$ (1165,4) Ber: C, 57,02; H, 7,83. Gef: C, 56,69; H, 7,83%); Nach Trocknen bei 130° im Hochvakuum. ($C_{55,3}H_{86,6}O_{23,6}$ (1129,4) Ber: C, 58,83; H, 7,73. Gef: C, 58,55; H, 7,74%).

Molgewichttitrationen in Methanol/Wasser 1:1 = 1124, 1143. Dünnschichtchromatographie (Laufmitte: Chloroform/Methanol 65:70 wassergesättigt) zeigt eine Hauptsubstanz $R_f = 0,60$ und zu etwa 5% einen Nachläufer $R_f = 0,55$.

Dreimalige Kristallisation aus Äthanol/Wasser führte zu einer grob-kristallinen Substanz. Nach Trocknen im Vakuumexsikkator über P_4O_{10} erhielt man: Schmp.: 230,5–232°, $[\alpha]_D^{20} + 24,4^\circ$ ($c = 1,0$; Äthanol). $C_{55,3}H_{86,6}O_{23,6} \cdot 4H_2O$ (1201,4) Ber: C, 55,31; H, 7,93. Gef: C, 55,21; H, 8,02%.

Die Dünnschichtchromatographie zeigt die Abwesenheit des Nachläufers vom $R_f = 0,55$. Die Substanz enthält ebenfalls als Zucker D-Glucuronsäure, D-Glucose, D-Xylose und D-Galaktose. Auch das Verhältnis der Säuren hat sich nicht wesentlich geändert. UV = 203 m μ , $\epsilon = 14,000$; IR (in Pyridin): 1645, 1708, 1733 cm $^{-1}$.

Aescinol-Kaliumsalz. 2 g Aescin wurden in 50 ml Äthanol/Wasser 1:1 mit 3% KOH 3 Std. unter Rückfluss erhitzt. Beim Abkühlen fiel das Kaliumsalz des Aescinols kristallin aus. Es wurde noch dreimal aus Wasser mit wenig Äthanol umkristallisiert. Schmp. 285–290° (Zers.) $[\alpha]_D^{20} + 27^\circ$ (Wasser/Methanol 8:5, $c = 0,5$). Nach saurer Hydrolyse fand man papierchromatographisch im System A und E als Zucker D-Glucuronsäure, D-Glucose, D-Xylose aber keine D-Galaktose. Als Aglycone sind Protoaecigenin und Barringtonol C vorhanden (Dünnschichtchromatographie).

Aescin durch Isopropanolextraktion. 300 g geviertelte, ungeschälte, frische Kastanien wurden mit 100 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Starmix zerkleinert und dann mit 300 ml Isopropanol 5 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es wurde abgesaugt und das Ungleiche insgesamt 3 mal mit Isopropanol extrahiert. Die Extrakte engte man auf ein kleines Volumen ein. Nach einigen Tagen hatte sich ein fester filtrierbarer Niederschlag abgesetzt (12,4 g), welcher die Saponine angereichert enthielt. Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G mit Chloroform/Methanol/Wasser 63:35:10 zeigte Aescin, $R_f = 0,19$, Aescin-nachläufer $R_f = 0,17$, sowie Oligosaccharide $R_f = 0,10$ –0,01.

10 g des Isopropanolextraktes wurden an 300 g Sephadex G-25 mit dest. Wasser als Elutionsmittel aufgetrennt, wobei man ~1 g angenehrt reinen Saponinkomplex erhielt. Es handelt sich dabei um ein

Salz des Aescins ("Gesamtsaponin"), das zur Gewinnung des Protoaecigenin-diesters direkt in der wässrigen Lösung mit Schneckenenzym versetzt wurde.

Bei dieser Extraktion wurde nicht auf die Erzielung einer hohen Ausbeute geachtet, sondern auf möglichst schonende Bedingungen, um eine Umwandlung insbesondere in der Art und Stellung der Säuren möglichst auszuschliessen.

Isolierung der Aglycone

Hydrolyse I. 5 g Aescin wurden in 85 ml Äthanol, 25 ml Wasser und 10 ml konz. HCl 14 Std. auf 90° erhitzt. Man verdünnte den Ansatz nach dem Abkühlen mit Wasser, dampfte die Hauptmenge Äthanol ab und schüttelte 4 mal mit insgesamt 250 ml Chloroform/Methanol 10:1 aus. Nach Rückwaschen mit Wasser wurde eingeeengt.

Den Rückstand löste man in 100 ml 5% methanol. KOH und erhitze 1 Std. unter Rückfluss. Darauf verdünnte man den Ansatz mit Wasser und schüttelte 4 mal mit Chloroform, bzw. Chloroform/Methanol 20:1 aus. Nach Rückwaschen der vereinigten Chloroformphasen hinterblieben nach dem Einengen 1·8 g einer Mischung der Aglycone.

Trennung der Aglycone. Die Mischung der Aglycone wurde auf 10 g SiO₂ aufgezogen und an einer Säule mit 700 g SiO₂ aufgetrennt. Eluiert wurde mit Chloroform, dem steigende Mengen Methanol (5 → 50%) zugesetzt wurden. Man erhielt neben Mischfraktionen an weitgehend reinen Fraktionen 63·4 mg Barringtonenol D, 199·3 mg Aescigenin, 338 mg Barringtonenol C und 1·020 g Protoaecigenin. Unter Berücksichtigung der Mischfraktionen entspricht das etwa 4% II; 14% I; 19% IV und 63% III.

Barringtonenol C-pentaacetat (VI). 500 mg Barringtonenol C-Fraktionen aus mehreren Hydrolysesätzen wurden in 2 ml Pyridin gelöst und mit 12 ml Acetanhydrid 14 Std. auf 120° unter N₂-Atmosphäre erhitzt. Die dunkelbraune Reaktionslösung wurde in NaHCO₃-haltiges Eiswasser gegeben und nach 3 Std. 4 mal mit Chloroform extrahiert. Nach Rückwaschen mit Wasser wurde die Chloroformphase eingeeengt (544 mg).

Zur Reinigung chromatographierte man die Substanz an 100 g Al₂O₃, Aktivitätsstufe IV, mit dem Lösungsmittel Benzol/Aceton 2:1 und erhielt 340 mg chromatographisch einheitliche Substanz, die aus Methanol/Wasser mit dem Schmp. 147–150°, [α]_D²⁰ – 10·4° (c = 0·8, Chloroform) erhalten wurde. (C₄₀H₆₀O₁₀) (700·9) Ber.: C, 68·54; H, 8·63. Gef.: C, 67·99; H, 8·36%.

R_f-Werte der Acetate bei der Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Benzol/Aceton 10:1: Barringtonenol C-pentaacetat 0·39, Protoaecigenin-hexaacetat 0·25, Aescigenin-tetraacetat 0·44, Barringtonenol D-triacetat 0·58.

Barringtonenol-C-tetraacetat. 100 mg Barringtonenol C-Säulenfraktionen löste man in 4 ml Pyridin/2 ml Acetanhydrid und erhielt 3 Std. auf 90°. Nach üblicher Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung an 50 g SiO₂ mit dem Lösungsmittel Benzol/Aceton 5:1 wurde das Hauptprodukt der Umsetzung Barringtonenol C-tetraacetat, in reiner Form erhalten. Schmp. 222–223°, [α]_D²⁰ + 14·9° (c = 1·0; Methanol) (C₃₈H₅₈O₉) (658·8) Ber.: C, 69·27; H, 8·87. Gef.: C, 68·92; H, 8·90%). Die Substanz erwies sich in allen untersuchten Eigenschaften als identisch mit dem von A. K. Barua isolierten Barringtonenol C-tetraacetat.

Barringtonenol C (IV). 200 mg Barringtonenol C-pentaacetat wurden 2 Std. mit 5 proz. methanolischer KOH unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz mit Wasser verdünnt und 3 mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Einengen der Chloroformphase kristallisierte man den Rückstand mehrfach aus Methanol um und erhielt chromatographisch reines Barringtonenol C vom Schmp. 302–308°, [α]_D²⁰ + 32·6° (c = 0·7, Dioxan). (C₃₀H₅₀O₅) (490·7) Ber.: C, 73·43; H, 10·27. Gef.: C, 73·28; H, 10·40%.

Barringtonenol C-tetrabenoat (VIII). 50 mg Barringtonenol C wurden in einer Mischung von 2 ml Benzol und 2 ml Pyridin gelöst. Die Lösung wurde in der Kälte mit 0·35 ml Benzoylchlorid versetzt und 12 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Darauf wurde die Mischung zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Toluol aufgenommen und die Lösung bei 80–90° am Rotationsverdampfer erneut eingedampft. Den Rückstand löste man in 5 ml Pyridin, setzte 2 ml Methanol hinzu, erhielt die Lösung 1 Std. zur Veresterung der Benzoësäure und ihres Anhydrids auf 70°, anschliessend wurde eingedampft. Den Rückstand nahm man in Chloroform auf, die Lösung wurde mit Sodalösung und Wasser gewaschen und eingeeengt. Nach Chromatographie des Rückstandes an 24 g SiO₂ mit Ligroin/Benzol-Gemischem erhielt man 40 mg reines Tetrabenoat vom Schmp. 314–317°, [α]_D²⁰ + 18° (c = 0·4, Chloroform). (C₅₈H₆₆O₉) (907·1) Ber.: C, 76·79; H, 7·33. Gef.: C, 77·19; H, 7·55%). Auch diese Substanz zeigte mit einem von A. K. Barua isolierten Material keine Schmelzpunktsdepression.

Protoaecigenin-Derivate. In analoger Weise wie beim Barringtonenol C beschrieben erhielt man die entsprechenden Protoaecigeninderivate.

Protoaecigenin-hexaacetat (V). Schmp. 140–141°, $[\alpha]_D^{20} - 3\cdot5^\circ$ ($c = 0\cdot7$, Chloroform). ($C_{42}H_{62}O_{12}$ (758·9) Ber: C, 66·47; H, 8·23. Gef: C, 65·80; H, 8·52%).

Protoaecigenin (III). Schmp. 303–311°, $[\alpha]_D^{20} + 31\cdot5^\circ$ ($c = 0\cdot7$, Dioxan). ($C_{30}H_{50}O_6$ (506·7) Ber: C, 71·11; H, 9·95. Gef: C, 70·88; H, 10·07%).

Protoaecigenin-pentabenzooat (VII). Schmp. 305–308°, $[\alpha]_D^{20} + 35\cdot3^\circ$ ($c = 0\cdot3$; Chloroform).

Barringtogenol D (II). 100 mg Barringtogenol C wurden mit 5 ml H_2O , 2 ml konz. HCl und 17 ml Äthanol zur Überführung in Barringtogenol D 28 Std. unter N_2 auf 80° erhitzt. Anschliessend wurde der Ansatz mit Wasser verdünnt, die Mischung 3 mal mit Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformphase mit wässrigem $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen und eingeengt. Die Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol 10:1 zeigte, dass etwa 40% Wasserabspaltungsprodukt entstanden waren. Durch Chromatographie an 30 g SiO_2 mit dem Laufmittel Ligroin/Aceton 20:1 konnten 33 mg Barringtogenol D rein erhalten werden. Aus Methanol erhielt man Kristalle vom Schmp. 304–311°, $[\alpha]_D^{20} + 49\cdot7^\circ$ ($c = 1$, Dioxan). ($C_{30}H_{48}O_4$ (472·7) Ber: C, 76·22; H, 10·24. Gef: C, 76·34; H, 10·52%).

Barringtogenol-D-triacetat (XI). 190 mg Säulenfraktionen der Aescinhydrolyse von Barringtogenol D wurden in 5 ml Pyridin und 2 ml Acetanhydrid gelöst und 24 Std. auf 60° erwärmt. Nach üblicher Aufarbeitung chromatographierte man das Umsetzungsprodukt zweimal an SiO_2 mit dem Laufmittel Benzol/1% Aceton und erhielt 92 mg reine Substanz, die aus Methanol/Wasser kristallisiert wurde. Schmp. 228–230°, $[\alpha]_D^{20} + 67\cdot5^\circ$ (Chloroform, $c = 0\cdot8$). ($C_{36}H_{54}O_7$ (598·8) Ber: C, 72·21; H, 9·09. Gef: C, 71·87; H, 9·39%).

Dieses Acetat war mit aus Barringtogenol C durch direkte Wasserabspaltung und Acetylierung hergestelltem sowie mit authentischer Substanz von A. K. Barua in allen untersuchten Eigenschaften identisch. Massenspektrum (siehe I.c.⁸) $m/e = 598, 538, 478, 348, 288, 249, 228, 215, 190, 189$.

Aescigenin (I). Durch mehrfache Kristallisation der Aescigenin-Säulenfraktionen aus Methanol erhielt man Aescigenin mit dem Schmp. 306–312°, $[\alpha]_D^{20} + 56\cdot5^\circ$ ($c = 0\cdot7$, 99% Äthanol). ($C_{30}H_{48}O_5$ (488·7) Ber: C, 73·73; H, 9·90. Gef: C, 74·00; H, 9·86%).

Aescigenin-tetraacetat. Durch Acetylierung in der beim Barringtogenol D beschriebenen Weise erhielt man Aescigenin-tetraacetat vom Schmp. 204–207°, $[\alpha]_D^{20} + 57\cdot3^\circ$ ($c = 0\cdot6$; Chloroform).

Hydrolyse II. 5 g Aescin wurden in 60 ml 60 proz. Äthanol gelöst, zur Lösung 3 ml konz. HCl zugesetzt und die Mischung 48 Std. auf 80° erhitzt. Anschliessend verdünnte man den Ansatz mit Wasser und schüttelte insgesamt 4 mal mit Chloroform aus. Nach Rückwaschen mit Wasser und Einengen erhielt man 2·8 g einer Mischung von Verbindungen. Dünnschichtchromatographisch an SiO_2 mit dem Laufmittel Benzol/Methanol 8:1 erkannte man zur Hauptsache folgende Substanzen (mit R_f -Werten): Substanz J (0·48), Substanz H (0·41), Substanz G (0·37), Barringtogenol D (0·35), Substanz E (0·34), Substanz F (0·30), Aescigenin (0·28), Substanz E (0·25), Barringtogenol C (0·24) und Protoaecigenin (0·15).

Das Substanzgemisch wurde an einer Säule mit 700 g SiO_2 und dem Laufmittel Chloroform, dem steigenden Mengen Methanol zugesetzt wurden, chromatographiert. Man erhielt dabei außer den Aglykonen und deren Wasserabspaltungsprodukten an chromatographisch angereicherten Fraktionen 80 mg Substanz H, 350 mg Substanz E und 180 mg Substanz F.

Durch Hydrolyse mit 2 n HCl während 2 Std. in Äthanol/Wasser lassen sich wesentlich höhere Ausbeuten an Esteraglykon erzielen.³³

Substanz H. Aus den Fraktionen der Säulenchromatographie erhielt man beim Stehenlassen schöne sternchenförmige Kristalle, die abfiltriert wurden. Schmp. 235·5–238°. UV-Spektrum: 203 m μ , $\epsilon = 14,200$. ($C_{35}H_{56}O_6 \cdot H_2O$ (590·8) Ber: C, 71·15; H, 9·90. Gef: C, 71·46; H, 10·04%).

Die alkalische Verseifung ergab laut Dünnschichtchromatographie Barringtogenol C und an Säuren wurden durch Gaschromatographie Tiglinsäure und Angelicasäure gefunden.

Substanz E. Aus den Fraktionen der Säulenchromatographie der Aescinhydrolyse kristallisierte die Substanz E aus. Die Fraktionen wurden etwas eingeengt und die Kristalle abgesaugt. Nach Umkristallisation aus Äthanol erhielt man Kristalle vom Schmp. 235–239°, $[\alpha]_D^{20} + 324^\circ$ ($c = 1\cdot2$, Äthanol). ($C_{35}H_{56}O_7 \cdot H_2O$ (606·8) Ber: C, 69·27; H, 9·63. Gef: C, 69·17; H, 9·80%). UV-Spektrum: 204·5 m μ , $\epsilon = 13,700$, IR (Pyridin): 1650, 1690, 1700 cm⁻¹. Die alkalische Spaltung ergab Protoaecigenin sowie Tiglinsäure, Angelicasäure und Spuren Essigsäure.

Substanz E zeigte bei nährerer chromatographischer Auftrennung einen Doppelfleck. Eine Trennung der beiden Substanzen gelang nicht vollständig. Bei der Säulenchromatographie wurden außerdem laufend Nebensubstanzen beobachtet, die vermutlich Umlagerungsprodukte darstellen. (Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G mit dem Laufmittel Benzol/Methanol 10:1, dreimal entwickelt: Hauptsubstanz $R_f = 0\cdot065$, daneben $R_f = 0\cdot045$ und $R_f = 0\cdot10$).

Die hier isolierte Substanz ist identisch mit der früher als Desglykoaecin bezeichneten.³¹ Wie bereits

von anderer Seite festgestellt wurde,³³ handelt es sich jedoch entgegen dem damaligen Strukturvorschlag um 21-Tigloyl (angeloyl)-protoaecigenin.

Substanz F. Die bei der Säulenchromatographie erhaltenen 180 mg Substanz F wurden zur Befreiung von chromatographisch sehr ähnlich wandernden Substanzen dreimal an 30 g SiO₂ mit dem Laufmittel Benzol/4% Methanol chromatographiert. Die chromatographisch einheitlich erhaltene Substanz zeigte nach zweimaliger Kristallisation aus Methanol einen Schmp. 159–165°, $[\alpha]_D^{25} + 47.6^\circ$ ($c = 0.8$, Methanol). UV = 204 mμ, ε = 13,000. IR (in KBr): 1647, 1714, Schulter bei 1700 cm⁻¹.

Die alkalische Spaltung ergab Protoaecigenin, Angelicasäure, Tiglinsäure und etwas Essigsäure. Auch die Substanz F zeigte unter geeigneten Bedingungen einen Doppelfleck (Benzol/Methanol 10:1, dreimal entwickelt) und ergab bei der Chromatographie Umwandlungsprodukte.

Enzymatische Hydrolise. 0.5 g Aescin wurden in 11 H₂O gelöst und mit 4 ml Schneckenenzym (Hersteller: Industrie Biologique Française, Gennevilliers) versetzt und der Ansatz mit etwas Toluol überschichtet. Nach Stehen bei Raumtemperatur während 10 Tage hatte sich ein voluminöser Niederschlag abgesetzt, der abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert wurde. Den Rückstand löste man in Benzol/Methanol 1:1, trennte die wässrige Schicht ab, filtrierte die Benzol/Methanol-Schicht und engte ein (254 mg). Dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: Benzol/Methanol 20:3) zeigten sich vor allem zwei Substanzen: Barringtonenol C-diester ($R_f = 0.41$) und Protoaecigenin-diester (XII) ($R_f = 0.24$). Ganz schwach fanden sich noch weitere Substanzflecke mit niedrigeren R_f -Werten.

Die wässrige Phase der Enzymspaltung zeigte papierchromatographisch (System A und E) Glucuronsäure, Glucose, Xylose und Galaktose.

Durch Säulenchromatographie an 30 g SiO₂ erhielt man mit Benzol und 2% Methanol 40 mg Barringtonenol C-diester und 152 mg Protoaecigenin-diester XII.

Protoaecigenin-diester XII. Die Substanz liess sich aus Benzol oder Äther/Petroläther umkristallisieren. Schmp. 238–247°, nach Kristallumwandlung bei ~135° (aus Benzol); $[\alpha]_D^{20} + 24.4^\circ$ ($c = 1.0$; Chloroform). Die alkalische Spaltung ergab Protoaecigenin und Säuren der gleichen Zusammensetzung wie beim Aescin. Dafür berechnet sich eine CH-Zusammensetzung von C_{37.5}H₅₉O₈. (C_{37.5}H₅₉O₈ (637.8) Ber: C, 70.61; H, 9.32. Gef: C, 70.99; H, 9.58%).

NMR-Spektrum (60 MHz) in CDCl₃: ~0.5 H bei 3.14 τ (olef. H der Tiglinsäure), ~0.5 H bei 3.95 τ (olefin H der Angelicasäure); 2 H (21α-H, 22β-H) eines AB-Spektrums, bei dem das bei niedrigerem Feld liegende Dublett etwa zur Hälfte eine andere chemische Verschiebung aufweist (Vergleich mit dem 90 MHz-Spektrum): 1 H 4.62 und 4.80 τ, 1 H 4.33 und 4.18 τ sowie 4.28 und 4.13 τ; 1 H bei 4.59 τ; (12-H). **NMR-Spektrum** (90 MHz) in CDCl₃: ~0.5 H bei 3.15 τ; ~0.5 H bei 3.93 τ; AB-Spektrum mit Signalen bei 4.77 und 4.64 τ sowie 4.31 und 4.20 τ (4.26 und 4.13 τ).

Massenspektrum: $m/e = 672$ (0.3%), 654 (0.25%), 630 (2.5%), 612 (1.4%), 552 (3.1%), 530 (2.2%), 512 (4.4%), 452 (9.3%), 388 (26%), 306 (28%), 297 (26%), 246 (17%), 224 (32%), 215 (60%), 198 (100%).

Hämolyse: Die Substanz zeigt bei einer Konzentration von 1.5 γ/ml vollständige Hämolyse gegenüber gewaschenen Erythrocyten.

Enzymatische Spaltung von "Gesamtsaponin"

"Gesamtsaponin" (2 g) wurden auf 1 l mit Wasser verdünnt (pH = 6), der Ansatz mit 9 ml Schneckenzym sowie etwas Toluol versetzt und die Mischung 10 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung mit dem Niederschlag wurde 3 mal mit Chloroform/Methanol 2:1 ausgeschüttelt und die organische Phase eingeengt. Die erhaltenen 950 mg enthielten neben unverändertem Saponin eine Mischung von Geninestern, die neben den Hauptbestandteilen Barringtonenol C-diester und Protoaecigenin-diester eine erhebliche Menge an polareren Estern enthielten (R_f -Werte: a = 0.41, d = 0.28, XII = 0.24, f = 0.21, g = 0.18, h = 0.15, j = 0.09, k = 0.08, m = 0.01).

Durch Säulenchromatographie fand man 78 mg Barringtonenol-diester (a), 250 mg Protoaecigenin-diester XII und insgesamt 180 mg der Substanzen f–m.

Der so gewonnene Protoaecigenin-diester (Schmp. 130/241–252°, $[\alpha]_D^{20} = + 25.6$ ($c = 1.0$, Chloroform)) stimmte in allen Eigenschaften mit dem aus Aescin gewonnenen überein. Diese Fraktion wurde nach Umkristallisation aus Benzol und Herstellung geeigneter Einkristalle zur Röntgenstrukturanalyse benutzt.²

In analoger Weise wurde auch aus einem Saponin, das durch Sephadextrennung aus dem Press ast hergestellt worden war, Protoaecigenin-diester vom Schmp. 130/241–247°, $[\alpha] + 23.1^\circ$ gewonnen. Die

* Aufgenommen mit dem Gerät HX 90 der Spectrospin A. G. Wir danken Herrn Dipl.-Chem. J. Schulz-Walz für die Aufnahme des Spektrums.

IR-Spektren der drei aus verschiedenen Aescinproben erhaltenen Protoaecigenin-diester waren praktisch identisch. Die entsprechenden Mischschmelzpunkte ergaben keine Depression.

Alkalische Verseifung der Aglykone aus der enzymatischen Hydrolyse

Ein Teil der durch Hydrolyse mit Schneckenenzym aus "Aescin" erhaltenen Aglykone wurde durch alkalische Hydrolyse in die acylfreien Verbindungen übergeführt. Dabei zeigten sich nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung an Kieselgel G mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol 10:1 Protoaecigenin ($R_f = 0\cdot13$), Barringtonol C ($R_f = 0\cdot19$) sowie Spuren (<1%) einer Substanz vom $R_f = 0\cdot33$. Die entsprechende Hydrolyse der Esteraglyka aus dem "Gesamtsaponin" zeigte Protoaecigenin, Barringtonol C sowie zu etwa je ~5% eine Substanz mit $R_f = 0\cdot25$ (A_3) und $R_f = 0\cdot33$ (A_4). Aescigenin und Barringtonol D besitzen deutlich verschiedene R_f -Werte.

Protoaecigenin-diester-tribenzoat. 50 mg Protoaecigenin-diester wurden schonend benzoiliert und nach Chromatographie an SiO_2 , dünnsschichtchromatographisch rein erhalten. Die Kristallisation aus Isopropanol ergab eine in Drusen kristallisierende Substanz von Schmp. 168–171°, $[\alpha]_{D}^{20} +47\cdot6^{\circ}$ ($c = 1\cdot0$; Chloroform).

Im IR (in CCl_4 , 2 cm Küvette) zeigte sich eine deutliche OH-Bande. NMR-Spektrum: ~ $\frac{1}{3}$ H (Angelat) ~4·0 τ; $\frac{1}{3}$ H (Tiglat) ~3·2 τ; 1 H (12-H) 4·63 τ; 2 H (21α,22β) 4·35 τ (S); 2 H (24-H₂) 5·27 (D, 12) und 5·52 (D, 12); 1 H (16β-H) 5·65 τ; 2 H (28-H₂) 5·87 (D, 11·5) und 6·99 (D, 11·5).

Trisilyl-protoaecigenin-diester. 50 mg Protoaecigenin-diester wurden in 5 ml Pyridin gelöst und die Lösung mit 0·5 ml Hexamethyl-disilazan und 0·5 ml Trimethylchlorsilan versetzt. Nach 3 Std. wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer bei 50° im Vakuum eingeengt, der Rückstand zweimal mit Toluol aufgenommen, die Lösung wieder abgedampft und dann der Rückstand in trockenem Benzol gelöst. Nach Filtration wurde erneut eingeengt und der Rückstand im IR und NMR vermessen.

IR-Spektrum (in CCl_4 , 2 cm Küvette) OH-Schwingung bei 3619 cm^{-1} . In CHCl_3 Banden bei 1645, 1700 und 1733 cm^{-1} . NMR-Spektrum siehe Abb. 2.

Säurebehandlung von Protoaecigenin-diester. 10 mg XII wurden in 10 ml CH_3OH mit 1 ml konz. HCl 20 Std. stehen gelassen. Nach der Aufarbeitung zeigte sich dünnsschichtchromatographisch keine Ausgangsstanz mehr. Es waren polarere Substanzen, offenbar Monoester, darunter Substanz E gebildet worden.

Alkalibehandlung. 10 mg Protoaecigenin-diester wurden in 10 ml Methanol + 1 ml 0·1 n NaOH 30 Min. stehen gelassen. Dünnsschichtchromatographisch zeigte sich wieder die Bildung von Substanz E neben weiteren Substanzen, die wahrscheinlich Umlagerungsprodukte und Protoaecigenin darstellen.

Herstellung von Rohsaponin durch Auspressen. 1 kg frische, reife Rosskastanien, die kurz zuvor von einem einzigen Baum gesammelt worden waren, wurden geschält, geviertelt und sofort in einer Drogenpresse bei 300 atm. ausgepresst. Der Presssaft, insgesamt 90 ml einer wässrig, ölichen Suspension, wurde in einem mit Methanol/Trockeneis auf –65° gekühlten Kolben aufgefangen und anschliessend gefriergetrocknet (3·1 g). Hiervon wurden 800 mg in dest. Wasser 2 mal an 80 g Sephadex G-25 chromatographiert, wobei man 160 mg chromatographisch einheitliche Hauptfraktion und 30 mg einer Fraktion erhielt, in der eine später von der Säule kommende Substanz angereichert war. Die Säulenfraktionen wurden jeweils durch Gefriergetrocknen eingeengt. (R_f -Werte an Kieselgel G mit Chloroform/Methanol/Wasser 65:35:10 Hauptsubstanz 0·13, Nebensubstanz 0·11).

Beide Fraktionen enthielten Protoaecigenin und Barringtonol C als Aglykon, das Säureverhältnis war etwas verschieden:

Essigsäure: Isobuttersäure: Methylbuttersäure: Angelicasäure: Tiglinsäure

Hauptsubstanz: 9:1:1:4:5

Nebensubstanz: 10:2:1:4:3

Beide Fraktionen wurden jeweils schonend silyliert. Dabei wurden alle Eindampfoperationen bei Raumtemperatur bei 10^{–2} Torr durchgeführt. Von beiden wurde anschliessend in CDCl_3 ein NMR-Spektrum angefertigt (siehe Tabelle 3).

Die Nebenfraktion (Presssaftsaponin II) hat den gleichen R_f -Wert wie Monoestersaponine, die sich beim längeren Stehen von Aescin in Lösung bilden. Nach dem NMR-Spektrum dürfte jedoch zumindest ein erheblicher Teil andersartig gebaut sein. Eventuell sind die OH-Gruppen an C-21 und C-22 mit zwei Molekülen Essigsäure verestert.

NMR-Spektren von persilyierten Saponinen. Aescin, "Gesamtsaponin" und "Theasaponin" aus *Thea sinensis*¹ wurden wie beim Protoaecigenin-diester beschrieben silyliert und anschliessend im NMR in

CDCl_3 bei 60 MHz vermessen. Dabei wurde der Bereich zwischen $3\text{--}5 \tau$ mit dem TAD gespeichert (10–150 Durchgänge), um insbesondere das Signal der 2 H an C-21 und C-22 neben dem H an C-12 gut erkennen zu können. Außerdem wurde so das olefinische Proton des Angelats bei $\sim 4\text{--}40$ und des Tiglats bei $3\text{--}1 \tau$ besser sichtbar.

Methylierung von Aescin. 780 mg "Tetrahydroaescin" wurden in 20 ml Dimethylformanid gelöst und die Lösung mit 4.05 g BaO, 191 mg $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ und 4 ml CH_3J versetzt. Nach Röhren des Ansatzes über Nacht würden erneut BaO und CH_3J zugesetzt und 16 Std. auf 40° erwärmt. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man 817.4 mg, die noch OH-Banden im IR zeigten. Nach nochmaliger Methylierung wurden 650 mg Substanz erhalten, die nur noch eine ganz schwache OH-Bande zeigten, die wohl von der OH-Gruppe an C-16 herrührte. Dünnschichtchromatographisch waren zwei Hauptsubstanzen nachweisbar, von denen die unpolare (410 mg) durch Säulenchromatographie an SiO_2 mit Benzol/Methanol 20:1 als Laufmittel abgetrennt wurde.

Diese Substanz wurde 18 Std. mit 10 ml 5 proz. methanolischer HCl erhitzt, dann setzte man dem Ansatz 10 ml Wasser hinzu, entfernte das Methanol im Vakuum und filtrierte die ausgefallenen Aglykone ab. Die wässrige Phase wurde 3 mal mit Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroformextrakte wurden eingeeengt (97.5 mg). Gaschromatographisch fanden sich (Butandiolsuccinatpolyester auf Kieselgur, bei 180°), vor allem α - und β -Methyl-2,3,4,6-tetramethyl-D-glucose neben geringen Mengen der Methylglykoside von 2,3,4-Trimethyl-D-xylose und 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose. Nach wässriger Hydrolyse (2 n HCl, 95° , 2 Std.) wurden auch papierchromatographisch (System B und C) die gleichen Zucker nachgewiesen. Trimethyl-glucosen konnten nicht beobachtet werden.

Die wässrige Phase der Methanolysen wurde unter Zusatz von 1 ml konz. HCl 5 Std. erhitzt und anschließend durch Filtrieren über Dow-3 neutralisiert. Nach Einengen der Lösung erhielt man 51 mg eines Methylzuckers, der, wie die papierchromatographische Untersuchung (System B, C und D) zeigte, fast ausschließlich aus 3,6-Dimethyl-D-glucose bestand. Die Substanz wurde an 15 g SiO_2 säulenchromatographisch mit dem Laufmittel Benzol/Aceton 7:3 gereinigt. Die erhaltenen 39 mg kristallisierten aus wasserfreiem Essigester und zeigten einen Schmp. $120\text{--}124^\circ$, $[\alpha]_D^{20} +92.5^\circ \rightarrow 44.1^\circ$ ($c = 1.0$, Wasser) ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_6$ (208.2) Ber.: C, 46.15; H, 7.75. Gef.: C, 45.94; H, 7.77%). Massenspektrum (Feldionisation):* m/e 209 (100%), ($\text{M}^+ + 1$); 191 (18%) ($\text{M}^+ + 1 - \text{H}_2\text{O}$). Die Substanz erwies sich in allen untersuchten Eigenschaften mit synthetisch dargestellter 3,6-Dimethyl-D-glucose³⁹ (Schmp. 119–124°) als identisch. Die gegenüber der Literatur etwas abweichenden Konstanten sind vermutlich auf grösere Reinheit zurückzuführen, da bei der Reinigung in Gegensatz zur Literatur³⁹ eine Chromatographie zwischengeschaltet wurde.

Danksagung—Wir danken der Fa. Dr. Madaus & Co. für die Überlassung von Aescin, Herrn Dr. H.-W. Fehlhaber für die Aufnahme und Interpretation der Massenspektren, Fr. L. Winterfeld und Herrn W. Stroh für verständnisvolle und geschickte experimentelle Mitarbeit, dem Landesamt für Forschung, Düsseldorf, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk für die zur Verfügung gestellten analytischen Geräte.

Herrn Dr. A. K. Barua, Calcutta, sind wir für die Überlassung von Vergleichssubstanzen sehr zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

- ¹ XXV. Mitteil.: R. Tschesche, A. Weber und G. Wulff, *Liebigs Ann.* im Druck.
- ² W. Hoppe, A. Gieren, N. Brodherr, R. Tschesche und G. Wulff, *Angew. Chem.* **80**, 563 (1968); *Angew. Chem. (Int. Ed.)* **7**, 547 (1968).
- ³ Herstellung nach W. Winkler und P. Patt, *Naturwissenschaften* **47**, 83 (1960).
- ⁴ L. Ruzicka, W. Baumgartner und V. Prelog, *Helv. Chim. Acta* **32**, 2057, 2069 (1949).
- ⁵ G. Cainelli, A. Melera, D. Arigoni und O. Jeger, *Ibid.* **40**, 2390 (1957).
- ⁶ R. Kuhn und I. Löw, *Liebigs Ann.* **669**, 183 (1963).
- ⁷ R. Kuhn und I. Löw, *Tetrahedron Letters* 891 (1964).
- ⁸ R. Tschesche und G. Wulff, *Ibid.* 1569 (1965).
- ⁹ A. K. Barua und P. Chakrabarti, *Tetrahedron* **21**, 381 (1965).
- ¹⁰ R. Got und A. Marnay, *Europ. J. Biochem.* **4**, 240 (1968).
- ¹¹ I. Yosioka, K. Imai und I. Kitagawa, *Tetrahedron Letters* 2577 (1967).

* Aufgenommen mit dem Gerät CEC-21-110 mit Feldionisation. Wir danken Herrn Professor H. D. Beckey und Herrn Dipl.-Phys. H. Krone, Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Bonn, für das freundliche Entgegenkommen bei der Durchführung dieser Messung.

- ¹² I. Yosioka, T. Nishimura, A. Matsuda, K. Imai und I. Kitagawa, *Ibid.* 637 (1967).
- ¹³ S. Itô und T. Ogino, *Ibid.* 1127 (1967).
- ¹⁴ T. Nakano, M. Hasegawa und J. B. Thomson, *Ibid.* 1675 (1967).
- ¹⁵ I. Yosioka, T. Nishimura, A. Matsuda und I. Kitagawa, *Ibid.* 5973 (1966).
- ¹⁶ W. Hoppe, A. Gieren und N. Brodherr, *Acta crystallogr. in Vorbereitung.*
- ¹⁷ T. Nakano, M. Hasegawa, T. Fukumaru, S. Tobinaga, C. Djerassi, L. J. Durham und H. D. Budzikiewicz, *Tetrahedron Letters* 365 (1967).
- ¹⁸ I. Yosioka, T. Nishimura, A. Matsuda und I. Kitagawa, *Ibid.* 5979 (1966).
- ¹⁹ I. Yosioka, A. Matsuda, T. Nishimura und I. Kitagawa, *Chem & Ind.* 2202 (1966).
- ²⁰ S. Itô, M. Kodama und M. Konoike, *Tetrahedron Letters* 591 (1967).
- ²¹ H. Itokawa, N. Sawada und T. Murakami, *Ibid.* 597 (1967).
- ²² S. Itô und T. Ogino, *Ibid.* 1127 (1967).
- ²³ R. Tschesche, B. T. Tjoa und G. Wulff, *Liebigs Ann.* **696**, 160 (1966).
- ²⁴ R. Tschesche, B. T. Tjoa und G. Wulff, *Tetrahedron Letters* 183 (1968).
- ²⁵ M. Kodama und S. Itô, *Chem. & Ind.* 1647 (1967).
- ²⁶ I. Yosioka, T. Nishimura, N. Watani und I. Kitagawa, *Tetrahedron Letters* 5343 (1967).
- ²⁷ S. G. Errington, D. E. White und M. W. Fuller; *Ibid.* 1289 (1967).
- ²⁸ S. Itô, T. Ogino, H. Sugiyama und M. Kodama, *Ibid.* 2289 (1967).
- ²⁹ H. Römisich, *Planta med. Stuttgart* **4**, 184 (1956).
- ³⁰ J. Wagner und J. Bosse, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **320**, 27 (1960).
- ³¹ R. Tschesche, U. Axen und G. Snatzke, *Liebigs Ann.* **669**, 171 (1963).
- ³² Siehe Annmerkung in R. Tschesche und U. Axen, *Naturwissenschaften* **51**, 359 (1964).
- ³³ R. Kuhn und I. Löw, *Tetrahedron* **22**, 1899 (1966).
- ³⁴ I. Löw, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **348**, 839 (1967).
- ³⁵ O. D. Hensens und K. G. Lewis, *Tetrahedron Letters* 3213 (1968).
- ³⁶ J. J. Dugan und F. de Mayo, *Canad. J. Chem.* **43**, 2033 (1965).
- ³⁷ J. Wagner und H. Hoffmann, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **348**, 1667 (1967).
- ³⁸ R. Kuhn, H. Egge, R. Brossmer, A. Gauhe, P. Klesse, W. Lochinger, E. Röhm, H. Trischmann und D. Tschampel, *Angew. Chem.* **72**, 805 (1960).
- ³⁹ D. J. Bell, *J. Chem. Soc.* 1553 (1936).
- ⁴⁰ J. Wagner und J. Bosse, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **322**, 254 (1960).
- ⁴¹ G. Vogel, M.-L. Marek und R. Oertner, *Arzneimittelforsch. im Druck.*
- ⁴² W. Stöcklin, E. Weiss und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **50**, 474 (1967).
- ⁴³ W. Stöcklin, *Ibid.* **50**, 491 (1967).
- ⁴⁴ I. Yosioka, K. Imai und I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* **15**, 135 (1967).
- ⁴⁵ I. Yosioka und I. Kitagawa, *Tetrahedron Letters* 2353 (1967).
- ⁴⁶ A. K. Barua, S. P. Dutta und B. C. Das, *Tetrahedron* **24**, 1113 (1968).
- ⁴⁷ A. K. Barua, S. P. Dutta und S. K. Pal, *J. Indian Chem. Soc.* **44**, 991 (1967); *Chem. Abstr.* **68**, 49885 (1968).
- ⁴⁸ R. Segal, H. Govrin und D. V. Zaitschek, *Tetrahedron Letters* 527 (1964).
- ⁴⁹ R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke, *Chem. Ber.* **92**, 3053 (1959).
- ⁵⁰ S. M. Partridge, *Nature, London* **164**, 443 (1949).
- ⁵¹ P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirotta, G. Ruffini und A. Sartori, *J. Chromatogr. Amsterdam* **3**, 343 (1960).
- ⁵² R. Tschesche und G. Wulff, *Tetrahedron* **19**, 621 (1963).
- ⁵³ H. C. Srivastava und G. A. Adams, *Canad. J. Chem.* **40**, 1415 (1962).
- ⁵⁴ M. T. Krauss, H. Jäger, O. Schindler und T. Reichstein, *J. Chromatogr. Amsterdam* **3**, 63 (1960).
- ⁵⁵ F. G. Fischer und H. Dörfler, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **301**, 224 (1955).
- ⁵⁶ G. Wulff, *J. Chromatogr. Amsterdam* **18**, 285 (1965).
- ⁵⁷ R. G. Ackman und J. C. Sipos, *Ibid.* **16**, 298 (1964).