Liebigs Ann. Chem. **721**, 209–219 (1969)

Über Triterpene, XXV[1]

Über die Struktur des „Theasaponins", eines Gemisches von Saponinen aus *Thea sinensis* L. mit stark antiexsudativer Wirksamkeit

von *Rudolf Tschesche, Alfred Weber* und *Günter Wulff*

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität, 53 Bonn

Eingegangen am 8. Juni 1968

Aus Samen von *Thea sinensis* L. wird ein kristallines Saponingemisch, „Theasaponin", isoliert; es ist im Aglykon-Anteil uneinheitlich und enthält vor allem Theasapogenol A, B und E, mit denen 1 Mol Essigsäure und 1 Mol einer Mischung von Tiglinsäure und Angelicasäure über die OH-Gruppen an C-21 und C-22 verestert sind. Die Struktur des Zucker-Anteils wird durch Methylierung und Partialhydrolyse ermittelt. Demnach trägt die Genin-ständige D-Glucuronsäure am C-2 einen β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl- und am C-3 einen β-D-Galaktopyranosyl-Rest.

Triterpenes, XXV[1]*. On the Structure of "Theasaponin", a Mixture of Saponins from Thea sinensis L. Exhibiting Strong Antiexudative Properties*

From the seeds of *Thea sinensis* L. a crystalline saponin mixture, "theasaponin", is isolated; its aglycon part is nonuniform. It mainly consists of theasapogenol A, B and E, in which 1 mole of acetic acid and 1 mole of a mixture of tiglinic acid and angelic acid are esterified at C-21 and C-22. The structure of the sugar moiety is elucidated by methylation and partial hydrolysis. Accordingly the glucuronic acid directly bound to the aglycon bears at C-2 a β-D-xylopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl residue and at C-3 a β-D-galactopyranosyl group.

In Samen des Teestrauches *Thea sinensis* L. (= *Camellia sinensis* O. Kuntze) findet sich ein Saponin-Gemisch, das hämolytische, expectorierende und uteruskontrahierende Wirkungen besitzen soll[2,3]. Wegen seiner Toxizität präparierten die Japaner im Altertum ihre Hieb- und Stichwaffen mit dem saponinhaltigen Samenöl[4]. In neuerer Zeit ist eine gute insektizide

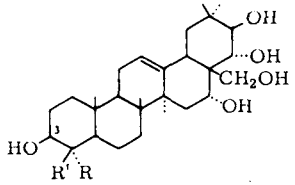
[1] XXIV. Mitteilung: *R. Tschesche, H. J. Mercker* und *G. Wulff*, Liebigs Ann. Chem. **721**, 194 (1969), voranstehend.

[2] *L. Weil*, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **239**, 363 (1901); *J. Halberkann*, Biochem. Z. **19**, 310 (1909).

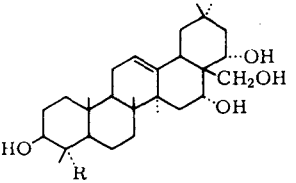
[3] *S. Tamura*, J. pharmac. Soc. Japan [Yakugakuzasshi] **76**, 144 (1956) [C. A. **50**, 8895 g (1956)].

[4] *Y. Katzuyama*, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **213**, 334 (1878).

Wirkung beim Reisanbau beschrieben worden[5,6]. *Ueda* und *Ishida*[7] haben aus den Samen erstmalig ein kristallines Saponingemisch erhalten. Nach Hydrolyse mit HCl und anschließend mit NaOH fand *Ueda*[8,9] zwei Aglykone, Theasapogenol A und B, für die er eine Hexahydroxy- bzw. Pentahydroxy-β-amyrin-Struktur annahm. Außerdem fand er nach Hydrolyse je 1 Mol. Angelicasäure, Glucuronsäure, Galaktose, Xylose und Arabinose. — Während neuere Untersuchungen über die Struktur des Saponins nicht bekannt sind, gelang es, die Struktur der Hauptaglykone Theasapogenol A[10] (**1**), B[10] (**2**) und E[11] (**3**) und der vier Nebenaglykonen Camelliagenin A[12,13] (**5**), B[12,13], C[12,13] und D[14] (**4**) aufzuklären.



1: R = CH_2OH, R' = CH_3 Theasapogenol A
2: R = CH_3, R' = CH_3 Barringtogenol C (= Theasapogenol B)
3: R = CHO, R' = CH_3 Theasapogenol E
4: R = CH_3, R' = CHO Camelliagenin D



5: R = CH_3 Dihydro-priverogenin A[15] (= Camelliagenin A)

Bei Untersuchungen über Saponine[16] wurden auf unsere Anregung hin die pharmakologischen Eigenschaften der Teesaponine untersucht, wobei eine starke antiexsudative Wirksamkeit festgestellt wurde (s. S. 213). — Aus den geschälten, frischen Samen des Tees[17] erhält man durch Extraktion mit Methanol/Wasser und Verteilen des Extraktes zwischen Wasser und n-Butanol aus der Butanolphase ein *Rohsaponin* in ca. 13% Ausbeute. Das gleiche Rohsaponin erhält man auch durch Wasser/n-Butanol-Verteilung aus einem in Japan handelsüblichen Präparat („Teaponin")[18,19].

[5] *K. Naramato*, Japan. Pat. 1679 ('50) v. 7. 6. 1950 [C. A. **46**, 8322i (1952)].
[6] *M. Trimidate*, Rev. brasil. Quim. **25**, 311 (1948) [C. A. **43**, 1878c (1949)].
[7] *M. Ishida* und *Y. Ueda*, J. pharmac. Soc. Japan [Yakugakuzasshi] **72**, 1523 (1952) [C. A. **47**, 8086b (1953)].
[8] *Y. Ueda*, J. pharmac. Soc. Japan [Yakugakuzasshi] **72**, 1525 (1952) [C. A. **47**, 8086c (1953)].
[9] *Y. Ueda*, Pharmac. Bull. [Tokyo] **2**, 175 (1954) [C. A. **50**, 720f (1956)].
[10] *I. Yosioka, T. Nishimura, A. Matsuda* und *I. Kitagawa*, Tetrahedron Letters [London] **1966**, 5973, 5979.
[11] *I. Yosioka, A. Matsuda, T. Nishimura* und *I. Kitagawa*, Chem. and Ind. **1966**, 2202.
[12] *H. Itokawa, S. Sawada* und *T. Murakami*, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 597.
[13] *S. Ito, M. Kodama* und *M. Konoike*, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 591.
[14] *S. Ito* und *T. Ogino*, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 1127.
[15] *R. Tschesche, B. T. Tjoa* und *G. Wulff*, Tetrahedron Letters [London] **1968**, 183.
[16] *R. Tschesche* und *G. Wulff*, Planta med. [Stuttgart] **12**, 272 (1964).
[17] Wir danken Herrn Dr. *B. T. Tjoa*, Hongkong, für die Beschaffung der frischen Samen.
[18] *K. Isome* und *K. Watanabe*, Japan. Pat. 173963 v. 24. 10. (1946) [C. A. **46**, 2243e (1952)].
[19] Für die Beschaffung von „Teaponin" der Isome Yuka Kogyo Co. Ltd., Japan, danken wir Herrn Dr. *H.-B. Schmittmann*, Velbert, Herrn Dr. *K. Kometani*, Tokio, und Herrn *T. Kasahara* von der Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

Bei saurer und nachfolgender alkalischer Hydrolyse des Rohsaponins werden als Aglykone vor allem Theasapogenol E, A und B sowie in geringer Menge Camelliagenin A und D gebildet. – Als Zucker fanden sich nach saurer Hydrolyse Glucuronsäure, Galaktose, Glucose, Xylose und Arabinose. Die quantitative Bestimmung ließ auf eine Mischung von Saponinen mit verschiedenen Zuckerketten schließen. Die nach alkalischer Hydrolyse erhaltenen Fettsäuren wurden gaschromatographisch halbquantitativ bestimmt, wobei Essigsäure, Isobuttersäure, α-Methylbuttersäure, Angelicasäure und Tiglinsäure im Verhältnis 2 : 1 : 1 : 3 : 1 gefunden wurden.

Offensichtlich enthält das Rohsaponin eine komplexe Mischung von Verbindungen, die sich sowohl im Aglykon- und Zuckerteil als auch in den Ester-artig gebundenen Säuren unterscheiden. Dieses Rohsaponin konnte chromatographisch bisher nicht aufgetrennt werden.

Jedoch erhält man durch viermaliges Umkristallisieren des Rohsaponins aus wäßr. Äthanol in ca. 40% Ausbeute ein *kristallisiertes Saponin*, das nach Schmp. 227–229° und $[\alpha]_D^{20} = +42°$ dem von *Ishida* und *Ueda*[7] isolierten „Theasaponin" entspricht. Durch Dampfdruckmessung wurde ein Molekulargewicht von 1249 ermittelt. Im Kristallisat fanden sich nur Essigsäure, Angelicasäure und Tiglinsäure im Verhältnis 4 : 3 : 1; aus einer Acetylgruppen-Bestimmung und einer quantitativen Hydrierung wurden 1 Mol Essigsäure und 1 Mol einer Mischung von Angelica- und Tiglinsäure gefunden.

Unter den *Zuckerbausteinen* ist keine Glucose mehr vorhanden. Die quantitative Bestimmung der Glucuronsäure-haltigen Zuckermischung wurde, wie beschrieben[20-22], durchgeführt. Dabei wurde die Zuckerzusammensetzung im kristallisierten „Theasaponin" selbst und an einem Saponin, dessen Uronsäure-Carboxyl zu $-CH_2OH$ reduziert worden war, durch Gaschromatographie der silylierten Hydrolyse-Bestandteile ermittelt. Aufgrund dieser Ergebnisse enthält das kristallisierte „Theasaponin" eine einheitliche Zuckerkette aus den vier Monosaccharid-Einheiten Glucuronsäure, Galaktose, Xylose und Arabinose.

Das Verhältnis der Aglykone ist durch die Kristallisation nicht wesentlich verändert. Man erhält die gleichen Bausteine wie aus dem Rohsaponin. Die quantitative Zusammensetzung des Aglykon-Anteils wurde durch Säulenchromatographie bestimmt:

45% Theasapogenol E	$C_{30}H_{48}O_6$	**3**
30% Theasapogenol A	$C_{30}H_{50}O_6$	**1**
15% Theasapogenol B	$C_{30}H_{50}O_5$	**2** (= Barringtogenol C)
5% Camelliagenin A	$C_{30}H_{48}O_6$	**5** (= Dihydro-priverogenin A)
5% Camelliagenin D	$C_{30}H_{50}O_4$	**4**

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

[21] *W. Hoppe, A. Gieren, N. Brodherr, R. Tschesche* und *G. Wulff*, Angew. Chem. **80**, 563 (1968); Angew. Chem., internat. Edit. **7**, 547 (1968).

[22] *G. Wulff* und *R. Tschesche*, Tetrahedron [London], im Druck.

Es finden sich im „Theasaponin" also drei Hauptglykoside, die entsprechend den Hauptaglykonen Theasaponin E, A und B genannt wurden.

Diese am kristallisierten „Theasaponin" gewonnenen Ergebnisse stimmen hinsichtlich des Aglykon-Anteils[9,14] und der Zuckerzusammensetzung[8] mit früheren gut überein. Dagegen ist sowohl die Essigsäure wie die Tiglinsäure früher übersehen worden. Auffallend ist die Mischung von insgesamt einem Mol Tiglinsäure und Angelicasäure. Analog treten im Aescin[21,22] und in der Gymnagensäure[23] je ein Mol gesättigte und ungesättigte Säuren der gleichen Art wie in den Saponinen des Tees auf. Der Übergang einer gemeinsamen Vorstufe in Tiglinsäure und Angelicasäure konnte weder an α-Hydroxy-α-methyl-buttersäureester noch an β-Hydroxy-α-methyl-buttersäureester nachgewiesen werden.

Ermittlung der Zuckerverknüpfung

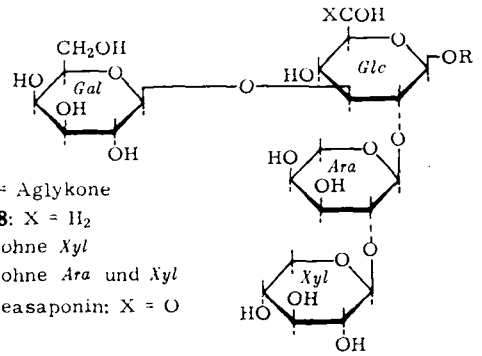
„Theasaponin" wurde nach *Anderson* und *Cree*[24] mit Methyljodid/Natriumhydrid in Dimethylsulfoxid methyliert. Diese neue Methylierungsmethode[25] war auch bei Anwendung auf Saponine anderer Herkunft den älteren Verfahren überlegen. Das permethylierte Derivat wurde mit $LiAlH_4$ am Uronsäure-Carboxyl reduziert und nachmethyliert. Nach Hydrolyse des permethylierten Derivates und Aufarbeitung erhielt man 2.3.4-Trimethyl-D-xylose, 2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose, 4.6-Dimethyl-D-glucose und 3.4-Dimethyl-L-arabinose, die durch Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie identifiziert wurden (Tab. 1 S. 218). – Nach Säulenchromatographie konnten die 2.3.4-Trimethyl-D-xylopyranose, die 4.6-Dimethyl-D-glucopyranose und die 2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktopyranose (diese als Anilid) kristallin gewonnen und durch direkten Vergleich mit authentischen Substanzen identifiziert werden. 3.4-Dimethyl-L-arabinopyranose wurde außerdem als kristallines Osazon charakterisiert.

Das Ergebnis der Methylierung zeigt, daß im „Theasaponin" die Zuckerkette an der Glucuronsäure verzweigt ist, daß die L-Arabinose sich innerhalb der Kette befindet und daß D-Xylose und D-Galaktose endständig angeordnet sind. Da von den vier Methylzuckern gleiche molare Mengen erhalten wurden, zeigt dieses Ergebnis ferner, daß alle Saponine im „Theasaponin" die gleiche Zuckerverknüpfung besitzen und daß es eine einzige Zuckerkette gibt, die demnach nur über eine OH-Gruppe glykosidisch am Aglykon gebunden sein kann.

Zur Aufklärung der Zucker-Reihenfolge und der Anknüpfung an C-2 und C-3 der Glucuronsäure wurden Partialhydrolysen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß man nur dann mit guten Ausbeuten zu auftrennbaren Hydrolysaten kommt, wenn die Säurereste vorher abgespalten und die Glucuronsäure zur Glucose reduziert worden ist. Das so erhaltene kristallisierte Tetrahydro-desacyltheasaponin (**6**) enthält zu 75% Tetrahydro-desacyltheasaponin A, das auch aus Theasaponin E nach Reduktion der Aldehyd-Gruppe entstand, und 15% Tetrahydro-desacyltheasaponin B.

[23] *W. Stöcklin, E. Weiss* und *T. Reichstein*, Helv. chim. Acta **50**, 474 (1967).
[24] *W. Anderson* und *G. M. Cree*, Carbohydrate Res. [Amsterdam] **2**, 162 (1966).
[25] *S. Hakomori*, J. Biochemistry [Tokyo] **55**, 205 (1964).

Durch Partialhydrolyse mit 0.025*n* äthanol. HCl entstehen aus **6** das Desxylo-Produkt **7** und das Desxylo-desarabino-Produkt **8**, die säulenchromatographisch in reiner, kristallisierter Form erhalten werden konnten. Methylierung und Spaltung von **7** und **8** ergaben die Methylzucker, die durch Papier- und Dünnschichtchromatographie eindeutig identifiziert werden konnten (Tab. 1). Damit ist geklärt, daß in **6** die Glucose (im „Theasaponin" entsprechend die Glucuronsäure) direkt ans Aglykon gebunden ist und daß an diese in 3-Stellung eine D-Galaktose und in 2-Stellung eine Xylosido-arabinose geknüpft ist. — Aus der Art der Methylzucker ergibt sich, daß alle Zucker in der Pyranose-Form vorliegen. Durch Vergleich der Molrotationen von **6**, **7** und **8** zeigt sich (Tab. 2, S. 219), daß die L-Arabinose α-, alle anderen Zucker β-gebunden sind.



Die Anknüpfungspunkte für die Zuckerkette und die Säuren an den Theasapogenolen wurden noch nicht geklärt. Man kann aber in Analogie zu vielen anderen Triterpensaponinen annehmen, daß die Zuckerkette an C-3 angreift. „Theasaponin" ist dem Aescin außerordentlich ähnlich. Die Säuren sind gleich, die Aglykone unterscheiden sich nur geringfügig oder sind im Barringtogenol C identisch, und die Zuckerkette ist ebenfalls an einer D-Glucuronsäure verzweigt. Da am Aescin die Stellung der Säuren kürzlich durch Röntgenstrukturanalyse festgelegt werden konnte[21], kann man zunächst auch für das „Theasaponin" annehmen, daß sich die Essigsäure an C-22 und die Tiglin- bzw. Angelicasäure an C-21 befinden*).

„Theasaponin" ist, wie die meisten anderen Saponine, fungistatisch wirksam, besonders gegen *Piricularia oryzae* (vollständige Wachstumshemmung bei 62 μg/ccm).

Unter den pharmakologischen Eigenschaften[26] ist die antiexsudative Wirksamkeit besonders ausgeprägt. Dabei ist auf Grund der größeren Zuckerkette die Wasser-

*) *Anmerkung bei der Korrektur* (20. 1. 69): Diese Annahme konnte inzwischen durch Vergleich der NMR-Spektren des persilylierten Aescins und des „Theasaponins" bestätigt werden[22].

26) Die pharmakologische Prüfung wurde wie früher beschrieben durchgeführt: *G. Vogel* und *M.-L. Marek*, Arzneimittelforsch. **12**, 813, 815 (1962); vgl. *G. Vogel, M.-L. Marek* und *R. Oertner*, Arzneimittelforsch. **18**, 1466 (1968). — Wir danken Herrn Professor Vogel von der Fa. Dr. Madaus & Co., Köln-Merheim, sehr für die Durchführung dieser Prüfung.

löslichkeit jedoch besser und die Toxizität geringer als beim Aescin. Seine D_{eff} 30% gegenüber dem durch Ovalbumin provozierten Rattenpfoten-Oedem beträgt 1.0 mg/kg, der hämolytische Index 1 : 37000[26].

Dem *Landesamt für Forschung* in Düsseldorf danken wir für die Unterstützung dieses Forschungsvorhabens, Herrn Professor *J. Schmidt-Thomé*, Farbwerke Hoechst AG, für die mikrobiologische Prüfung und Herrn Professor *I. Yosioka*, Osaka-Fu, Japan, für die Übersendung von Vergleichssubstanzen. A. Weber dankt der *Dr. Karl-Merck-Stiftung* für die Bewilligung eines Stipendiums.

Beschreibung der Versuche

Die *Schmelzpunkte* wurden mit einem Mikroskop-Heiztisch nach Kofler-Weygand bestimmt. Die Messung der *optischen Drehung* erfolgte mit dem Polarimeter 141 von Perkin-Elmer. Die *IR-Spektren* (in KBr, CCl_4) wurden mit dem Spektrophotometer Perkin-Elmer, Modell 221, mit Gitterprismen-Austauscheinheit gemessen. – Die *CH- und N-Bestimmungen* wurden von der Analytischen Abteilung unseres Institutes, die *Molekulargewichtsbestimmungen* (osmometrisch) und die *Acetylbestimmung* von der Fa. Dr. F. Pascher, Bonn, ausgeführt. – Zur *Gaschromatographie* benutzte man das Gerät F 7/HF von Perkin-Elmer mit Integrator D2 und Kienzle-Digitaldrucker mit ca. 30 ccm He/Min. und Wärmeleitfähigkeitszelle oder 25 ccm N_2 und Flammen-Ionisationsdetektor (FID). – Die *Dünnschichtchromatographie* an Kieselgel G (Merck) wurde wie üblich durchgeführt[27]; es wurde mit Chlorsulfonsäure/Eisessig (1 : 2) oder mit Anilinphthalat in Isobutanol[28] angefärbt. – Zur *Säulenchromatographie* benutzte man Kieselgel der Fa. Gebr. Herrmann, Köln. – Die *Papierchromatographie* wurde an Papier von Schleicher & Schüll (2043 b) absteigend ausgeführt. System A: Essigester/Pyridin/Wasser (3.6 : 1 : 1.15)[29]; System B: Benzol/Äthanol/Wasser/25proz. wäßr. Ammoniak (200 : 47 : 14 : 1)[30]; System C: n-Butanol/Wasser/CCl_4 (4 : 4 : 3)[31]; System D: Methyläthylketon, gesätt. mit 2proz. wäßr. Ammoniak[32]; System E: Pyridin/Essigester/Eisessig/Wasser (5 : 5 : 1 : 3)[33].

Isolierung des „Theasaponins": a) 10 g frische *Teesamen*, nach dem Schälen 6.8 g, wurden mit einem Ultraturrax unter Methanol/Wasser (4 : 1) zerkleinert. Nach 3maligem Extrahieren wurde i. Vak. eingeengt, die wäßr. Phase mit Salzsäure auf pH 3 eingestellt und 3mal mit n-Butanol ausgeschüttelt. Nach Einengen der Butanolphase verblieben 866 mg einer Substanz, die nach Dünnschichtchromatographie im wesentlichen aus Teesaponinen bestand.

b) 150 g *„Teaponin"* (Handelssaponin der Isome Yuka Kogyo Co. Ltd., Japan, aus Teesamen durch Methanolextraktion gewonnen) wurden in 1.5 *l* Wasser gelöst und mit HCl auf pH 2–3 angesäuert. Nach 5maligem Extrahieren mit je 1.5 *l* n-Butanol und Waschen mit Wasser engte man ein. Dieser Butanolextrakt (47.8 g) zeigte die gleiche Zusammensetzung wie der aus frischen Samen gewonnene.

27) *R. Tschesche, W. Freytag* und *G. Snatzke*, Chem. Ber. **92**, 3053 (1959).
28) *S. M. Partridge*, Nature [London] **164**, 443 (1949).
29) *P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirotta, G. Ruffini* und *A. Sartori*, J. Chromatogr. [Amsterdam] **3**, 343 (1960).
30) *H. C. Srivastava* und *G. A. Adams*, Canad. J. Chem. **40**, 1415 (1962).
31) *R. Tschesche* und *G. Wulff*, Tetrahedron [London] **19**, 621 (1963).
32) *S. C. Williams* und *J. K. N. Jones*, Canad. J. Chem. **45**, 275 (1967).
33) *F. G. Fischer* und *H. Dörfel*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **301**, 224 (1955).

Der *Rückstand* des Butanolextraktes wurde 4mal aus 70proz. Äthanol umkristallisiert; es wurden 19.5 g Nadeln vom Schmp. 227–229°, $[\alpha]_D^{20} = +42°$ ($c = 2.7$, Äthanol), erhalten.

$C_{59}H_{90}O_{27} \cdot 2H_2O$ (1267.4) Ber. C 55.90 H 7.42 Gef. C 55.54 H 7.39

Mol.-Gew. 1249 (osmometr. in Äthanol)

Nach Trocknen bei 110° im Hochvakuum:

$C_{59}H_{90}O_{27}$ (1231.4) Ber. C 57.56 H 7.32 Gef. C 57.60 H 7.37

Hydrierung: In Eisessig mit $Pd/BaSO_4$ bei 25.5° wurde 1 Mol H_2 aufgenommen (ber. 0.158%, gef. 0.147%).

Acetylbestimmung: Nach saurer Hydrolyse 1 Mol Essigsäure (ber. 3.32%, gef. 3.24%).

Bestimmung der Aglykone: 1.2 g kristallisiertes „*Theasaponin*" wurden in 150 ccm 3 *n* H_2SO_4 8 Stdn. auf 100° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit Chloroform ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen und der Chloroformextrakt eingedampft. Der Rückstand (547 mg) wurde in 60 ccm 5proz. methanol. *Kalilauge* 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit Wasser auf das Doppelte verdünnt und i. Vak. eingeengt. Die wäßr. Suspension extrahierte man 3mal mit Chloroform/Methanol (3 : 1) und erhielt nach Einengen 428 mg, die an 900 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol (9 : 1) chromatographiert wurden. Dabei wurden 19 mg *Camelliagenin D*, 17 mg *Camelliagenin A*, 183 mg *Theasapogenol E*, 124 mg *Theasapogenol A* und 57 mg *Barringtogenol C* erhalten, deren R_F-Werte an Kieselgel G mit Benzol/Methanol (85 : 15) 0.89, 0.87, 0.51, 0.49, 0.32 betrugen (Vergleich mit authent. Proben). Nach der entsprechenden Hydrolyse des Butanolextraktes zeigte die nachfolgende Dünnschichtchromatographie das Vorliegen der gleichen Aglykone an.

Bestimmung des Zuckeranteils: a) Nach dem qualitativen papierchromatographischen Nachweis (Systeme A und E) von Xylose, Galaktose, Arabinose und Glucuronsäure bzw. Glucose hydrolysierte man zur quantitativen Untersuchung 45 mg „*Theasaponin*" in 3 ccm 3 *n* HCl, 1 ccm Dioxän und 4 ccm Benzol 4 Stdn. bei 95° (Bad). Nach dem Abkühlen trennte man die Benzolschicht ab und neutralisierte die wäßr. Phase nach 3maliger Extraktion mit Chloroform mit Dowex-3. Die wäßr. Lösung wurde eingeengt, der Rückstand, wie beschrieben, silyliert und die Umsetzungsprodukte gaschromatographiert[20]. Man erhielt ein molares Verhältnis von Galaktose: Xylose : Arabinose wie 1.08 : 1.05 : 1.00.

b) 45 mg „Theasaponin" wurden mit CH_2N_2 bei 0° in Methanol verestert und anschließend i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ccm H_2O gelöst und mit 6 mg $NaBH_4$ versetzt. Nach 2 Stdn. zerstörte man vorsichtig das überschüssige $NaBH_4$ mit Eisessig und entfernte mit Amberlite CG 50/I und Dowex-1 Kationen und Anionen. Das so reduzierte „Theasaponin" wurde wie oben hydrolysiert und silyliert. Man ermittelte ein molares Verhältnis von Glucose : Galaktose : Xylose : Arabinose wie 1.09 : 1.01 : 1:00 : 1.07.

Entsprechend erhielt man aus dem Butanolextrakt ohne Reduktion ein Verhältnis von Glucose : Galaktose : Xylose : Arabinose wie 0.79 : 1.00 : 0.71 : 0.65 und nach der Reduktion wie 1.01 : 1.00 : 0.73 : 0.63.

Bestimmung der flüchtigen Säuren: Je 70 mg „*Theasaponin*" bzw. *Butanolextrakt* wurden in 15 ccm 5proz. äthanol. *Kalilauge* 20 Stdn. bei 20° belassen. Danach setzte man das gleiche Volumen Wasser zu und engte ein. Die zurückbleibende gelbe Suspension wurde auf pH 2–3 angesäuert und filtriert. Die klare Lösung extrahierte man 8 Stdn. mit Äther, trocknete mit

Na_2SO_4 und engte auf 1 ccm ein. Von dieser Lösung verwendete man 5 µl zur Gaschromatographie, die an einer Säule (2 m × 3 mm), gefüllt mit 20% Bis-[2-äthyl-hexyl]-sebacinat + Sebacinsäure auf Celite 545 (60/100 mesh), bei 130° durchgeführt wurde; Strömungsgeschwindigkeit 55 ccm N_2/Min., Anzeige FID mit Strömungsteilung 1 : 4. Retentionszeiten: *Essigsäure* 10.1; *Isobuttersäure* 26.2; *α-Methyl-buttersäure* 48.5; *Angelicasäure* 70; *Tiglinsäure* 100 Min.

Methylierung des „Theasaponins": 5 g *„Theasaponin"* in 200 ccm Methanol wurden bei 0° so lange mit äther. *Diazomethan* versetzt, bis eben eine bleibende Gelbfärbung auftrat. Nach dem Einengen nahm man in 100 ccm Dimethylsulfoxid auf und fügte unter Rühren bei Raumtemperatur innerhalb von 2 Stdn. 4.5 g NaH (gepulvert, Fluka) und 25 ccm Methyljodid hinzu[24]. Die Suspension wurde 14 Stdn. gerührt und mit 1.5 *l* Chloroform versetzt. Darauf wurde 8mal mit je 1.5 *l* Wasser ausgeschüttelt. Dem vorletzten Waschwasser fügte man 40 mg $Na_2S_2O_4$ hinzu. Durch Eindampfen der Chloroform-Phase erhielt man 5.5 g *Ester.* — Er zeigte im IR-Spektrum (2-cm-Küvette, CCl_4) eine nur sehr schwache OH-Bande bei 3615 cm^{-1} und war dünnschichtchromatographisch im wesentlichen einheitlich.

Oxydation: Zum Nachweis, daß die schwache OH-Bande nur auf die schwer methylierbare 16-OH-Gruppe des Aglykons zurückgeht, wurden 33 mg Ester in 2.2 ccm absol. Aceton mit 0.2 ccm *Oxydationslösung* nach *Jones*[34] oxydiert und der Überschuß mit einigen Tropfen Methanol zerstört. Dann wurde mit Chloroform extrahiert, der Extrakt eingeengt, der Rückstand in 5 ccm Methanol gelöst und zur Veresterung der CO_2H-Gruppe vom oxydierten Theasapogenol E mit 4 ccm äther. *Diazomethan* versetzt. Die erhaltene Substanz zeigte im IR-Spektrum keine OH-Bande mehr und ergab nach Methanolyse und wäßr. Nachhydrolyse die gleichen Methylzucker wie eine Probe des nicht oxydierten Methylierungsproduktes.

Reduktion: Das *Methylierungsprodukt* (5.4 g) in 50 ccm wasserfreiem Äther versetzte man innerhalb 30 Min. mit 1.2 g *$LiAlH_4$*. Anschließend erwärmte man 3 Stdn. auf 40°. Dann zerstörte man den Überschuß an $LiAlH_4$ mit 2 ccm Aceton, brachte auf pH 5, filtrierte, schüttelte mit Chloroform aus und engte den Extrakt ein (5.1 g).

5 g des reduzierten *Permethyl-Derivates* wurden wie beschrieben mit *CH_3J/NaH* in Dimethylsulfoxid einmal nachmethyliert (4.9 g).

Isolierung der Methylzucker

Hydrolyse: 4.9 g *nachmethyliertes, reduziertes Methylierungsprodukt* wurden in 60 ccm 5proz. methanol. *Salzsäure* 6 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Anschließend setzte man das gleiche Volumen Wasser hinzu und engte bei Raumtemperatur i. Vak. ein. Die ausgefallenen Aglykone wurden abfiltriert und 2mal mit je 10 ccm Wasser gewaschen, die wäßr. Lösung wurde mit 12 ccm konz. Salzsäure 4 Stdn. auf 95° erhitzt. Nach dem Abkühlen neutralisierte man durch Filtrieren über Dowex-3, engte ein und erhielt 1.2 g *Methylzucker.* Durch Papierchromatographie in den Systemen B, C und D sowie durch Dünnschichtchromatographie mit Diisopropyläther/Methanol (5 : 1.2) konnten *2.3.4-Trimethyl-xylose, 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose, 4.6-Dimethyl-xylose* und *3.4-Dimethyl-arabinose* nachgewiesen werden. Aus 20 mg *nicht nachmethyliertem, reduziertem Methylierungsprodukt* erhielt man analog *2.3.4-Trimethyl-xylose, 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose, 3.4-Dimethyl-arabinose* und *4-Monomethyl-glucose.*

[34] *K. Bowden, J. M. Heilbron, E. R. H. Jones* und *B. C. L. Weedon,* J. chem. Soc. [London] **1946**, 39.

Trennung der Methylzucker: 1.2 g *Methylzucker-Gemisch* wurden an 400 g *Kieselgel* mit Chloroform und steigenden Mengen Methanol chromatographiert, wobei man 540 mg einer Mischung an *Trimethyl-xylose* und *Tetramethyl-galaktose* (unpolare Methylzucker) sowie 520 mg einer Mischung von *Dimethyl-glucose* und *Dimethyl-arabinose* erhielt. — Die *unpolaren Methylzucker* wurden erneut an 180 g *Kieselgel* mit Cyclohexan und 2–12% Aceton chromatographiert. Dabei erhielt man, jeweils chromatographisch einheitlich, 245 mg *2.3.4-Trimethyl-D-xylose* und 262 mg *2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose*.

2.3.4-Trimethyl-α-D-xylose. — Die säulenchromatographisch erhaltene Fraktion wurde 3mal aus Äther/Petroläther (1 : 2) umkristallisiert und ergab farblose Säulen und Rhomben vom Schmp. 90—92°, $[\alpha]_D^{20} = +17.4°$ (Enddrehung; $c = 1.35$, H_2O; Lit.[31]: Schmp. 90—92°, $[\alpha]_D^{20} = +17.6°$).

$C_8H_{16}O_5$ (192.2) Ber. C 49.99 H 8.39 Gef. C 50.32 H 8.44

2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose-anilid. — Die erhaltene sirupöse *Tetramethyl-galaktose* löste man in 5 ccm absol. Äthanol und erwärmte mit 0.2 ccm frisch dest. Anilin 2 Stdn. auf 90°. Anschließend versetzte man mit 3 ccm Wasser und erhielt nach 12 Stdn. einen Kristallbrei, der abfiltriert und 2 mal aus wäßr. Äthanol umkristallisiert wurde. Nadeln vom Schmp. 196—197° (unter Sublimation; Lit.[31]: Schmp. 197—198°).

$C_{16}H_{25}O_5N$ (311.4) Ber. N 4.50 Gef. N 4.61

Trennung der polaren Methylzucker: An 6 Platten (36 × 22 cm), die mit 40 g *Kieselgel G* in 55 ccm Wasser beschichtet waren, wurden 440 mg mit $CHCl_3$/MeOH (91 : 9) aufgetrennt, wobei nach Elution der abgenommenen Zonen 180 mg *3.4-Dimethyl-L-arabinose* und 172 mg *4.6-Dimethyl-α-D-glucose* chromatographisch rein erhalten wurden. Die Zonen wurden mit Jod-Dampf sichtbar gemacht, markiert und bei 50° vom Jod befreit.

4.6-Dimethyl-α-D-glucose. — Nach 2maligem Umkristallisieren aus Methanol/Essigester (1 : 1) schmolzen die Kristalle bei 159—160°, $[\alpha]_D^{20} = +63.9°$ (Enddrehung; $c = 1.2$, H_2O; Lit.[31]: Schmp. 159—162°, $[\alpha]_D^{20} = +63.5°$).

$C_8H_{16}O_6$ (208.2) Ber. C 46.15 H 7.75 Gef. C 46.07 H 7.79

3.4-Dimethyl-L-arabinose. — Nach R_F-Wert mit authent. Substanz bei Papierchromatographie in System B, C und D identisch. — $[\alpha]_D^{20} = +138°$ ($c = 1.3$, H_2O; Lit.[32]: $[\alpha]_D^{20} = +137°$).

Osazon: 125 mg *Phenylhydrazin-hydrochlorid* wurden in 0.6 ccm heißer 20proz. Natriumacetat-Lösung gelöst. Nach Filtration erhitzte man mit 55 mg *3.4-Dimethyl-arabinose* 40 Min. auf 100°. Das beim Abkühlen ausfallende Osazon kristallisierte in gelben Nadeln vom Schmp. 142—143° (mehrmals aus Äthanol/Wasser; Lit.[35]: Schmp. 142°).

$C_{19}H_{29}O_3N_4$ (357.5) Ber. N 15.72 Gef. N 15.58

Partialhydrolyseprodukte

Reduktion des „Theasaponins": In 600 ccm wasserfreiem Dioxan wurden 9 g „Theasaponin" bei 60° unter Rühren während 4 Stdn. mit 2.8 g $LiAlH_4$, suspendiert in 200 ccm Dioxan, versetzt, wobei die Temperatur bis zum Sdp. des Dioxans anstieg (Rückfluß). Nach 3 Stdn. erhitzte man weitere 3 Stdn. auf 100°. Nach dem Abkühlen wurde etwas Aceton, anschließend

[35] *P. Andrew, D. H. Ball* und *J. K. N. Jones*, J. chem. Soc. [London] **1953**, 4093.

Tabelle 1. Chromatographische Trennung der Methylzucker aus **6** und den Partialhydrolyseprodukten **7** und **8**

Substanz	aus	Papierchromatographie			Dünnschicht
		R_{TMG}-Wert[a]	R_{TMG}-Wert[b]	R_{TMA}-Wert[c]	R_F-Wert[d]
2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose	–	1.00	1.00	1.40	0.45
2.3.4-Trimethyl-D-xylose	**6**	0.92	0.78	–	0.51
2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose	**6**, **7**, **8**	0.75	–	1.52	0.34
2.3.5-Trimethyl-L-arabinose	–	0.98	1.08	1.48	0.42
2.3.4-Trimethyl-L-arabinose	**7**	0.95	0.97	1.00	0.40
3.4.6-Trimethyl-D-glucose	–	0.65	0.32	0.97	0.26
2.4.6-Trimethyl-D-glucose	**8**	0.58	0.28	0.91	0.22
2.3-Dimethyl-L-arabinose	–	–	–	0.79[e]	–
3.4-Dimethyl-L-arabinose	**6**	0.30	–	0.42	0.28
3.5-Dimethyl-L-arabinose	–	–	–	1.13[e]	–
4.6-Dimethyl-D-glucose	**6**, **7**	0.19	0.11	0.38	0.11

[a] Bez. auf 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose im System n-BuOH/Wasser/CCl_4 (4 : 4 : 3)[31].
[b] Bez. auf 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose im System Benzol/Äthanol/Wasser/NH_3 (200 : 47 : 14 : 1)[32].
[c] Bez. auf 2.3.4-Trimethyl-L-arabinose im System Methyläthylketon, gesätt. mit 2proz. wäßr. Ammoniak [32].
[d] System Diisopropyläther/MeOH (5 : 1.2).
[e] Tabellenwerte nach Lit.[32].

Wasser und zuletzt 2*n* HCl hinzugefügt. Nach Filtration engte man unter laufendem Zusatz von Wasser ein und extrahierte anschließend 3 mal mit n-Butanol. Nach Einengen des Butanolextraktes erhielt man 6.2 g chromatographisch einheitliches *reduziertes Desacyl-theasaponin* **6**. Die Chromatographie an *Kieselgel* mit Chloroform/Methanol/Wasser (65 : 30 : 10) ergab Kristalle vom Schmp. 138–139° (aus Methanol/Wasser), $[\alpha]_D^{20} = +17.6°$ (*c* = 1.23, Methanol/Wasser = 1 : 1).

$C_{52}H_{86}O_{24}$ (1095.3) Ber. C 57.03 H 7.86 Gef. C 56.67 H 7.93

Partialhydrolyse: 6.2 g **6** in 600 ccm Äthanol wurden mit 200 ccm 0.1 *n HCl* 16 Stdn. auf 65° erhitzt. Nach dem Erkalten fügte man 200 ccm Wasser hinzu und engte i. Vak. ein. Die wäßr. Lösung extrahierte man 3 mal mit n-Butanol und erhielt nach Eindampfen 4.1 g Partialhydrolyseprodukt. Dieses wurde an 1.2 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser (65 : 30 : 10) chromatographiert, wobei 350 mg reines **7** (R_F-Wert 0.52), 520 mg **8** (R_F-Wert 0.47) und 640 mg **6** (R_F-Wert 0.42) erhalten wurden.

Desxylo-tetrahydro-desacyl-theasaponin (**7**). – Nach Kristallisation aus 80proz. Äthanol Schmp. 145–147°, $[\alpha]_D^{20} = +27.3°$ (*c* = 1.29, Methanol/Wasser = 1 : 1).

$C_{47}H_{78}O_{20}$ (963.1) Ber. C 58.62 H 8.11 Gef. C 58.11 H 8.09

Desxylo-desarabino-tetrahydro-desacyl-theasaponin (**8**). – Nach Kristallisation aus Methanol/Aceton (9 : 1) Schmp. 130–131°, $[\alpha]_D^{20} = +28.8°$ (*c* = 1.18, Methanol/Wasser = 1 : 1).

$C_{42}H_{70}O_{16}$ (831.0) Ber. C 60.72 H 8.43 Gef. C 60.57 H 8.39

Methylierung von **7** *und* **8**: Je 35 mg von **7** bzw. **8** wurden, wie auf S. 216 beschrieben, in Dimethylsulfoxid mit *CH_3J/NaH* methyliert und anschließend gespalten. Papierchromatographisch wurden aus **7** *2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose*, *2.3.4-Trimethyl-L-arabinose* und *4.6-Dimethyl-D-glucose*, aus **8** *2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose* und *2.4.6-Trimethyl-D-glucose* nachgewiesen.

Tabelle 2. Vergleich der Molrotationen

Substanz	Molekulargewicht	vorhandene Zucker	$[M]_D$	Differenz gef.	Differenz ber.[a]
6	1094	D-Glucose D-Galaktose L-Arabinose D-Xylose	+192°	−70°	−108° (β) [b]
7	962	D-Glucose D-Galaktose L-Arabinose	+262°	+24°	+28° (α)[c]
8	830	D-Glucose D-Galaktose	+238°	−65°	−61° (β.β) [d]
Theasapogenole (für das Gemisch ber.)	506	—	+303°		

[a] Vergleichsdrehungen $[M]_D$ in Wasser[36]. — [b] β-CH_3-D-xylopyranosid −108°; α-CH_3-D-xylopyranosid +253°. — [c] β-CH_3-D-arabinopyranosid +403°; α-CH_3-D-arabinopyranosid +28°. — [d] β-CH_3-D-glucopyranosid −62°; α-CH_3-D-glucopyranosid +306°; β-CH_3-D-galaktopyranosid +1°; α-CH_3-D-galaktopyranosid +380°.

[36] *J. Conchie, G. A. Levvy* und *C. A. Marsh*, Advances in Carbohydrate Chemistry **12**, 182 (1957).

[111/68]