

[Chem. Pharm. Bull.
32(2) 490—496 (1984)]

**Chemische und Chemotaxonomische Untersuchungen der Pterophyten.
XLV.¹⁾ Chemische Untersuchungen der Inhaltsstoffe von
Glaphyopteridopsis erubescens (WALL.) COPEL.**

NOBUTOSHI TANAKA,^a TAKURO SADA,^a TAKAO MURAKAMI,^{*,a}
YASUHISA SAIKI^b und CHIU-MING CHEN^c

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo,^a Funakawara-machi,
Shinjuku-ku, Tokyo, 162, Japan, Department of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin
University,^b Arise, Igawatani-machi, Nishi-ku, Kobe, 673, Japan and
Department of Chemistry, National Tsing Hua University,^c
Kuang Fu Road, Hsinchu, Taiwan, China*

(Eingegangen am 11, Juni, 1983)

The fronds extracts of *Glaphyopteridopsis erubescens* (WALL.) COPEL. contain besides the already known flavanol glycosides (afzelin and quercitrin) three new flavan-4-ol glycosides, eruberin A(I), B(II) and C(III), which belong to a new type of proanthocyanidin. By means of spectroscopic and chemical methods, the structures 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethyl-2'',4(S)-oxido-2(R)-flavan-5- β -D-glucopyranoside (I), 4(S),5,7-trihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethyl-2(R)-flavan-5,7-O- β -D-digluco-pyranoside (II) and 5,7-dihydroxy-4(S),4'-dimethoxy-6,8-dimethyl-2(R)-flavan-5,7-O- β -D-digluco-pyranoside (III) are proposed. Eruberin C(III) may be an artifact.

Keywords—*Glaphyopteridopsis erubescens*; fern; Thelypteridaceae; chemotaxonomy; flavan-4-ol glycoside; structure; spectroscopic method; chemical reaction

Aus dem MeOH-Extrakt der Wedeln von *Glaphyopteridopsis erubescens* (WALL.) COPEL. (jap. Name: Taiyoshida) wurden neben Afzelin und Quercitrin drei neue Flavan-4-ol-Glykoside isoliert, die als Eruberin A(I), B(II) und C(III) benannt wurden.

Eruberin A(I) kristallisierte aus CHCl₃/MeOH in Form farbloser Nadeln, C₂₄H₂₈O₉ vom Schmp. 157—160 °C (Zers.) und der optischen Drehung $[\alpha]_D^{20} + 88.0^\circ$ ($c = 0.6$, MeOH). I zeigt im Ultraviolett (UV)-Spektrum Absorptionsbanden bei 225, 275 und 282 nm ($\log \epsilon$ 4.29, 3.24 und 3.21). Im Infrarot (IR)-Spektrum (KBr) erscheinen u.a. die Banden für OH (3350 cm⁻¹), für einen Benzol-Ring (1620, 1520 cm⁻¹) und für einen Äther (1245 cm⁻¹). I lieferte bei der Methylierung mit CH₂N₂ einen Monomethyläther (IV), was auf das Vorliegen einer phenolischen Hydroxy-Gruppe hindeutet. Bei der sauren Hydrolyse ergab I D-Glukose und ein Anthocyanidin-Derivat (V) (UV: $\lambda_{\max}^{0.01\% \text{HCl/MeOH}}$ 442 nm). Also handelt es sich bei I um ein Proanthocyanidin-Glykosid.²⁾ Das ¹H-Nuklear Magnetische Resonanz (NMR)-Spektrum weist die Signale für die *p*-disubstituierten Phenylprotonen auf, welche als Dublett (2H, $J = 8$ Hz) bei δ 6.93 und Dublett (2H, $J = 8$ Hz) bei δ 7.28 auftreten. Des weiteren kann die Anwesenheit einer aromatischen Methoxygruppe (s, 3H, δ 3.68) und zweier aromatischen Methylgruppen (s, 3H, δ 2.48 und s, 3H, δ 2.56) nachgewiesen werden. Im ¹³C-NMR-Spektrum werden die Signale der *sp*²-aromatische C-Atome, die denen des A-Ringes zugeordnet werden können, bei δ 156.0 (s), 152.7 (s), 151.1 (s), 111.0 (s), 109.3 (s) und 105.1 (s) registriert, während die Signale der aromatischen C-Atome des B-Ringes bei δ 160.7 (s), 134.6 (s), 128.5 (2d) und 114.7 (2d) erscheinen. Diese Daten weisen auf das Substitutionsmuster des Dimethylphloroglucin-Typs am Ring-A und die *p*-Substitution am Ring B hin. Das Massenspektrum mit dem Molekülpeak bei m/z 460 zeigt Hauptfragmente bei m/z 191 und 134 und

den Basispeak bei m/z 298 ($M^+ - C_6H_{10}O_5$), was zeigt, daß eine Methoxygruppe in 4'-Stellung des B-Ringes stehen sollte (siehe Schema I). Demnach kommt dem Anthocyanidin V die Struktur eines 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidins zu, das sich als identisch mit dem aus Matteucinol³⁾ durch $NaBH_4$ -Reduktion und Säurebehandlung hergestellten Vergleichsmaterial erwies. Im Aliphatenbereich des ^{13}C -NMR-Spektrums sind die Signale von drei C-Atomen des heterozyklischen Ringes bei δ 38.2 (t), 67.0 (d) und 74.6 (d) außer denjenigen der D-Glukose nachweisbar. Entkopplung auf das Doppeldublett bei δ 5.06 (1H, $J=3$ und 11 Hz) vereinfacht das Dublett von Doppeldubletts bei δ 2.07 (1H, $J=4$, 11 und 15 Hz) zu einem Doppeldublett ($J=4$ und 15 Hz) und das Doppeldublett bei δ 2.37 (1H, $J=3$ und 15 Hz) zu einem Dublett ($J=15$ Hz). Beim Entkoppeln des Dubletts bei δ 5.30 (1H, $J=4$ Hz) vereinfacht sich das Dublett von Doppeldubletts bei δ 2.07 zu einem Doppeldublett ($J=11$ Hz und 15 Hz). Die beiden Signale bei δ 2.07 und 2.37 haben die gemeinsamen geminalen Kopplungskonstanten von 15 Hz und sind den Protonen an C-3 zuzuordnen. Unter der Voraussetzung, daß der 2-Seitenphenyl-Rest die äquatoriale Lage einnimmt, was für alle bisher bekannten Flavanone zutrifft, stehen C(2)-H und C(3)-H_{ax} antiperiplanar, wofür sich die große Kopplungskonstante errechnen lassen sollte. Infolgedessen läßt sich das Doppeldublett bei δ 5.06 dem C(2)-Proton zuordnen, und das Dublett bei δ 5.30 entspricht dem C(4)-Proton, das aufgrund seiner Kopplungskonstante pseudoäquatorial orientiert ist. Aus dem Wert der chemischen Verschiebung (δ 5.30) ergibt sich, daß I eine O-Funktion in 4-Stellung trägt. Beim Kochen von I mit 95 proz. Essigsäure wurde ein Anthocyanidin-Glykosid (VI) erhalten, dessen enzymatische Hydrolyse D-Glukose und V lieferte. Damit kommt für die Glykosidierungsstelle in I die 5-Stellung oder 7-Stellung in Betracht. Acetylierung von I mit Ac_2O und Pyridine lieferte ein Tetraacetat (VII), und Permethylierung nach Hakomori ergab einen Tetramethyläther (VIII). Also besitzt I neben einer phenolischen Hydroxygruppe drei freie alkoholische Hydroxygruppen. Methanolyse von VIII ergab Methyl-3,4,6-tri-O-methyl-D-glukosid, aber keinen erwarteten Methyläther von V, der in mehrere Produkte hätte zerfallen müssen. Alle drei alkoholischen Hydroxygruppen in I befinden sich im Zuckeranteil. Demnach müßte D-Glukose nicht nur glykosidisch sondern auch über die Ätherbrücke zwischen C-4 und C-2'' an den Flavan-Körper angefügt sein, was nur möglich ist, wenn die Glykosidierung nicht am C-7 sondern am C-5 stattgefunden hat. Die absolute Konfiguration von I läßt sich aufgrund der Nuclear-Overhauser-Effekt-Messung ermitteln. Das Signal für das Proton an C-2'' bei δ 4.05 (1H, t, $J=8$ Hz) läßt sich durch Einstrahlen auf das anomere Proton eindeutig zuordnen. Sättigung von C(4)-Proton ergibt einen NOE auf C(2'')-Proton (ca. 22%) und auf C(3)-Proton (axial) (ca. 12%); damit ist C(4)-H ebenso β -ständig wie C(2'')-H. (siehe Abb. II) Diese spektroskopischen Daten sprechen für eine 2(R),4(S)-Konfiguration am Flavan-4-ol-System. Die β -Verknüpfung des Zuckers läßt sich

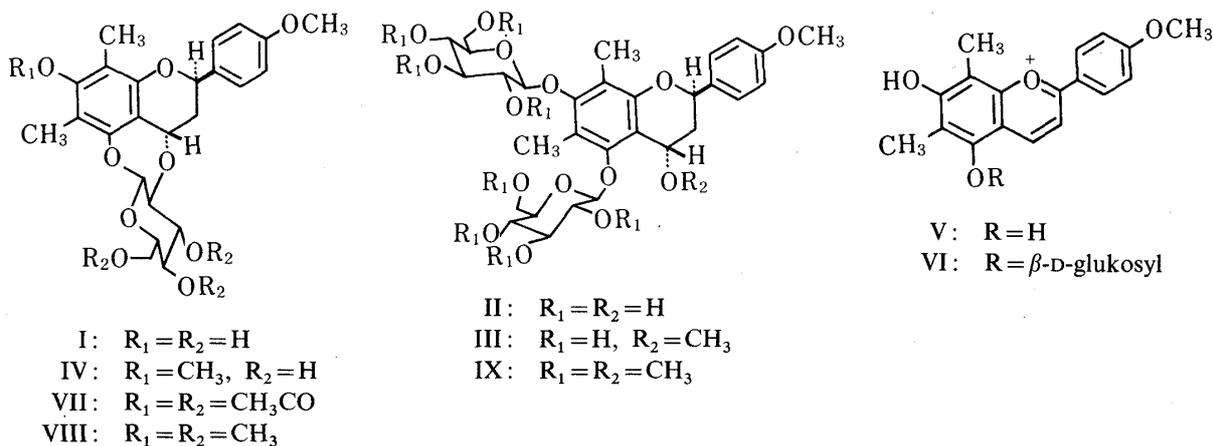
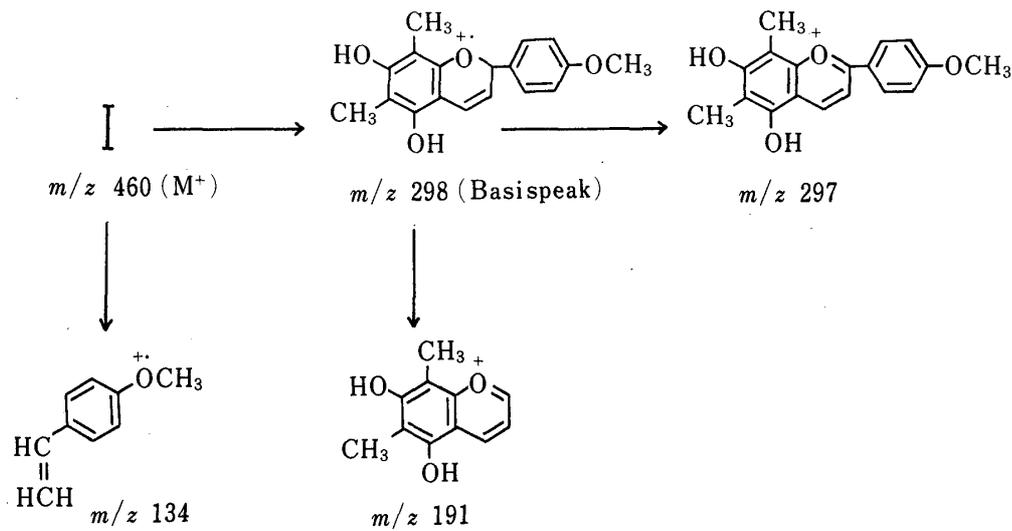


Abb. I



Schema I

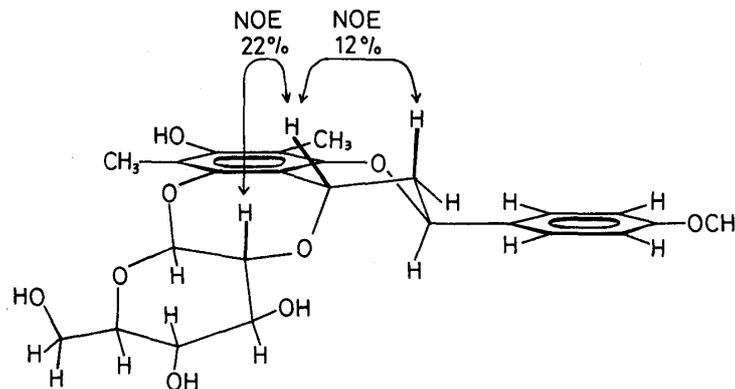


Abb. II

auch aus den Kopplungskonstanten des anomeren Protons bei δ 5.59 ($J=8$ Hz) ableiten. Die bisher angeführten Ergebnisse sind nur mit der Struktur eines 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethyl-2'',4(*S*)-oxido-2(*R*)-flavan-5-*O*- β -D-glukopyranosids vereinbar.

Eruberin B (II), $C_{30}H_{40}O_{15}$, kristallisierte aus $CHCl_3/MeOH$ in Form farbloser Nadeln und zeigte einen Schmp. 173–177 °C und eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{20} +10.0^\circ$ ($c=0.6$, MeOH). Das UV-Spektrum ist mit demjenigen von I deckungsgleich und die spektroskopischen Daten (UV, IR und 1H -NMR) weisen auf das Vorliegen einer dem Eruberin A (I) verwandten Struktur hin. Die saure Hydrolyse von II lieferte ebenfalls wie bei der von I 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin und D-Glukose. Also handelt es sich bei II wie bei I um ein Proanthocyanidin-Glykosid.²⁾ Aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum (siehe Tabelle) ergibt sich die Anwesenheit von zwei Glykosyl-Resten. Die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der C-Atome des heterozyklischen Ringes (δ 37.8 (t), 59.4 (d) und 73.4 (d)) waren denen von I ähnlich. Im 1H -NMR-Spektrum des Permethylläthers (IX) sind die Signale bei δ 5.27 (1H, dd, $J=2$ und 12 Hz) und 4.81 (1H, triplettartiges s) nachweisbar, die bei äquatorialer Anordnung des 2-Seitenphenyl-Restes jeweils dem Proton an C-2 und C-4 zuzuordnen sind. Die pseudoäquatoriale Orientierung des C(4)-H ist aus seiner Signalmultiplizität (triplettartiges s) zu entnehmen. Beim Kochen von II in CH_3COOH -MeOH (1 : 4, v : v) wurde ein Produkt vom Schmp. 154–159 °C (Zers.) und der optischen Drehung $[\alpha]_D^{20} -2.6^\circ$ ($c=0.7$, MeOH), das in allen Eigenschaften mit Eruberin C(III) identisch war, erhalten. Das 1H -NMR-Spektrum (CD_3OD) von III zeigt gegenüber dem von II ein zusätzliches Signal für die Protonen der

TABELLE I. ^{13}C -NMR-Chemische Verschiebungen (CD_3OD , δ) von I—IV

	I	IV	II	III
C-2	74.6	74.7	73.4	73.7
C-3	38.2	38.0	37.8	34.7
C-4	67.0	66.8	59.4	68.9
C-5	152.7 ^{a)}	153.1 ^{a)}	152.6 ^{a)}	153.8 ^{a)}
C-6	111.0 ^{b)}	116.4 ^{b)}	118.5 ^{b)}	118.7 ^{b)}
C-7	156.0 ^{a)}	159.5 ^{a)}	155.8 ^{a)}	155.8 ^{a)}
C-8	109.3 ^{b)}	116.1 ^{b)}	117.3 ^{b)}	117.5 ^{b)}
C-9	151.1 ^{a)}	151.6 ^{a)}	152.2 ^{a)}	153.1 ^{a)}
C-10	105.1	109.1 ^{b)}	116.1 ^{b)}	112.8
Ar-CH ₃	8.6	9.0	10.0	10.4
Ar-CH ₃	9.5	9.6	12.0	12.5
C-1'	134.6	134.4	134.9	135.2
C-2'	128.5	128.6	128.3	128.4
C-3'	114.7	114.8	114.7	114.8
C-4'	160.7	160.7	160.5	160.7
C-5'	114.7	114.8	114.7	114.8
C-6'	128.5	128.6	128.3	128.4
Ar-OCH ₃	55.7	55.7	55.7	55.8
Ar-OCH ₃		60.5		56.1
Glc-1''	102.5	102.4	105.7, 104.3	106.4, 105.4
Glc-2''	78.8	78.8	75.5, 75.5	76.0, 75.7
Glc-3''	75.7	75.9	78.1, 77.7	78.4, 78.1
Glc-4''	71.8	71.6	71.7, 71.2	71.7, 71.7
Glc-5''	76.8	76.6	77.7, 77.5	77.9, 77.9
Glc-6''	63.1	62.9	62.9, 61.9	63.0, 62.8

a, b) Die Zuordnungen sind eventuell austauschbar.

aliphatischen Methoxygruppe. Durch Permethylierung von III nach Hakomori war ein Permethyläther zugänglich, der in allen Eigenschaften mit IX übereinstimmte. Beim Vergleich des ^{13}C -NMR-Spektrums mit demjenigen von II ist das Signal für C-4 um 9.5 ppm nach tieferem Feld verschoben, und die Signale für die beiden benachbarten C-3 und C-10 sind jeweils um 3.1 ppm und 3.3 ppm nach höherem Feld verschoben (siehe Tabelle). Damit mußte III der 4-O-Methyläther von II sein. Methanolyse von IX lieferte 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin (V) und Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glukosid. Demnach sind die D-Glukosen über die Hydroxygruppen in 5- und 7-Stellung glykosidisch verbunden, und die β -Verknüpfung der beiden D-Glukosen läßt sich aus den Kopplungskonstanten von $J = 8$ Hz für die Signale der anomeren Protonen bei δ 4.49 und 4.44 entnehmen. Enzymatische Hydrolyse von II mittels Rohhesperidinase ergab D-Glukose und Eruberin A (I), das sich in Acetat-Pufferlösung (pH 3.8) sekundär gebildet hatte. Diese Ergebnisse sind mit der 2(R)-Konfiguration vereinbar, und die *trans*-Anordnung der Protonen an C-2 und C-4 weist auf eine 4(S)-Konfiguration hin. Damit muß dem Eruberin B die Struktur eines 4(S),5,7-Trihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethyl-2(R)-flavan-5,7-O- β -D-diglukopyranosid (II) und dem Eruberin C 5,7-Dihydroxy-4(S),4'-dimethoxy-6,8-dimethyl-2(R)-flavan-5,7-O- β -D-diglukopyranosid (III) zukommen.

Als natürliche monomere Proanthocyanidine sind bisher nur Flavan-3,4-diol-Derivate bekannt.²⁾ Die Anwesenheit der Substanzen, welche die Eigenschaften der Flavan-4-ole besitzen, ist in den Pflanzen nachgewiesen worden.⁴⁾ Diese Glykoside sind die aus den Pflanzen erstmals isolierten Flavan-4-ol-Derivate, aber Eruberin C(III) könnte ein Artefakt sein.

Experimenteller Teil

Betreffs verwendeter Geräte und Techniken siehe die vorangehende Mitteilung.¹⁾

Isolierung der Glykoside—2000 g Wedeln von *Glaphyroidopsis erubescens* (WALL.) COPEL., die Dezember 1980 in Tengchih und Fenchihu (Alishan)/Taiwan, China gesammelt worden waren, wurden mit MeOH (5 l × 3) heiß extrahiert. Der konzentrierte Extrakt wurde auf eine Aktivkohle-Säule (200 g, eingeschlammmt mit MeOH) gegeben und mit MeOH (30 l) und CHCl₃-MeOH (3 : 7, 30 l) eluiert. Nach dem Eindampfen der vereinigten Eluate wurde der Rückstand an Kieselgel (100 g) mit CHCl₃-MeOH steigender Polarität säulenchromatographiert. Die mit CHCl₃-MeOH (9 : 1) erhaltenen Eluate wurden nach dem Eindampfen an Kieselgel (15 g) mit Äther chromatographiert. Die Eruberin A enthaltenden Fraktionen wurden zur Trockne gebracht und der Rückstand aus MeOH-CHCl₃ kristallisiert. Man erhielt 100 mg Eruberin A(I). Die mit CHCl₃-MeOH (3 : 7 und 4 : 6) erhaltenen Eluate wurden nach dem Einengen stehengelassen. Dabei schied sich der gelbbraune Niederschlag ab, der Afzelin und Quercitrin enthielt. Zu ihrer Auftrennung wurde er der Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatten, CHCl₃-MeOH (10 : 3)) und anschließender Säulenchromatographie (Kieselgel, CHCl₃-MeOH) unterworfen. Kristallisation aus CHCl₃-MeOH lieferte 50 mg Afzelin und 150 mg Quercitrin. Das Filtrat wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand an Kieselgel (60 g) mit CHCl₃-MeOH steigender Polarität chromatographiert. Die mit CHCl₃-MeOH (3 : 1) erhaltenen Eluate enthielten Eruberin B(II) und C(III). Ihre Auftrennung gelang durch DCCC(CHCl₃-MeOH-H₂O, 9 : 16 : 10) und anschließende wiederholte präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatten, H₂O-gesättigtes BuOH und CHCl₃-MeOH-H₂O, 35 : 15 : 1). Abschließend wurden sie über eine Kieselgel-Säule (MeOH-CHCl₃) gereinigt. Kristallisation aus MeOH-CHCl₃ ergab 140 mg Eruberin B(II) und 30 mg Eruberin C(III).

Eruberin A(I)—Farblose Nadeln aus CHCl₃-MeOH. Schmp. 157–160 °C (Zers.) und $[\alpha]_D^{20} + 88.0^\circ$ ($c = 0.6$, MeOH). MS m/z : 460.1756 (M^+ für C₂₄H₂₈O₉, Ber. 460.1733), 299 (88%), 298 (100%, C₁₈H₁₈O₄), 297 (63%, C₁₈H₁₇O₄), 267 (9%), 191 (11%), 166 (11%), 154 (11%), 134 (10%), 121 (14%). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 225 (4.29), 275 (3.24), 282 (3.21). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3350, 2920, 1620, 1520, 1245, 1140, 840. ¹H-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 2.07 (1H, ddd, $J = 4, 11$ und 15 Hz, 3-H_{ax}), 2.37 (1H, dd, $J = 3$ und 15 Hz, 3-H_{eq}), 2.48 (3H, s, arom. CH₃), 2.56 (3H, s, arom. CH₃), 3.68 (3H, s, arom. OCH₃), 3.9–4.7 (6H, m, Zuckerprotonen), 5.06 (1H, dd, $J = 3$ und 11 Hz, 2-H), 5.30 (1H, d, $J = 4$ Hz, 4-H), 5.59 (1H, d, $J = 8$ Hz, anomeres Proton), 6.93 (2H, d, $J = 8$ Hz, 3'-H und 5'-H), 7.28 (2H, d, $J = 8$ Hz, 2'-H und 6'-H), 10.26 (1H, s, OH).

Eruberin A Monomethyläther (IV)—25 mg I in 2 ml MeOH wurden mit überschüssiger ätherischer CH₂N₂-Lösung versetzt und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt und aus AcOEt-CHCl₃ kristallisiert. Ausbeute 20 mg, farblose Nadeln. MS m/z : 474.1855 (M^+ für C₂₅H₃₀O₉, Ber. 474.1890), 340 (8%), 313 (100%), 312 (50%, C₁₉H₂₀O₄), 311 (33%, C₁₉H₁₉O₄), 297 (20%, C₁₈H₁₇O₄), 281 (7%), 205 (13%), 194 (14%), 166 (12%), 145 (14%), 134 (14%), 121 (30%), 91 (16%). Schmp. 151–154 °C. ¹H-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 1.96 (1H, breites d, $J = 15$ Hz, 3-H), 2.23 (3H, s, arom. CH₃, überlagert von 3-H), 2.38 (3H, s, arom. CH₃, teilweise überlagert von 3-H), 3.59 (3H, s, arom. OCH₃), 3.66 (3H, s, arom. OCH₃), 3.8–4.7 (6H, m, Zuckerprotonen), 5.01 (1H, dd, $J = 3$ und 12 Hz, 2-H), 5.22 (1H, d, $J = 3$ Hz, 4-H), 5.57 (1H, d, $J = 8$ Hz, anomeres H), 6.93 (2H, d, $J = 9$ Hz, 3'-H und 5'-H), 7.28 (2H, d, $J = 9$ Hz, 2'-H und 6'-H).

Saure Hydrolyse von I—20 mg I wurden in 5 ml 3 proz. Salzsäure 5 h erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert. 4 mg 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin (V) wurden erhalten. Das Filtrat wurde nach üblicher Weise aufgearbeitet, und 5 mg D-Glukose ($[\alpha]_D^{20} + 48.0^\circ$ ($c = 0.25$, H₂O)) wurden gewonnen, die sich nach Trimethylsilylierung gaschromatographisch identifizieren ließ.

5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin (V)—Rote Nadeln aus MeOH. Schmp. > 280 °C. MS m/z : 297.1119 (M^+ für C₁₈H₁₇O₄, Ber. 297.1125), 296 (Basis-Peak), 267, 148, 135, 115, 83, 77. UV $\lambda_{\max}^{0.01\% \text{HCl/MeOH}}$ nm (log ϵ): 282 (4.02), 333 (3.64), 442 (4.15), 480 (4.04, sh). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3300, 2930, 1660, 1610, 1510, 1375, 1265, 1180, 1070, 840, 770. ¹H-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.95 (3H, s), 2.04 (3H, s), 3.85 (3H, s), 7.06 (1H, d, $J = 8$ Hz, überlagert mit den Protonen bei δ 7.08), 7.08 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.84 (1H, d, $J = 8$ Hz, überlagert mit den Protonen bei δ 7.92), 7.92 (2H, d, $J = 8$ Hz). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 182.1 (s), 161.6 (s), 157.2 (s), 152.2 (s), 150.8 (s), 131.9 (d), 127.2 (d), 127.2 (d), 123.3 (s), 116.9 (s), 115.1 (s), 114.6 (d), 114.6 (d), 105.7 (s), 100.4 (d), 55.4 (q), 9.5 (q), 7.7 (q).

Darstellung der Vergleichssubstanz aus Matteucinol (5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylflavanon)—80 mg Matteucinol in 5 ml MeOH wurden mit 20 mg NaBH₄ nach und nach versetzt und 2 h bei Zimmertemperatur gerührt. Das überschüssige NaBH₄ wurde mit 20% CH₃COOH-MeOH zersetzt. Die Reaktionsmischung wurde in 30 ml Eiswasser gegeben und mit AcOEt ausgeschüttelt. Nach dem Waschen und Trocknen der organischen Phase wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde aus AcOEt kristallisiert. 40 mg 4,5,7-Trihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylflavan wurden als farblose Nadeln vom Schmp. 158–160 °C (Zers.) erhalten. MS: m/z 316.1307 (M^+ für C₁₈H₂₀O₅, Ber. 316.1311), 314, 299, 298 (Basis-Peak), 297, 283, 267, 191, 166, 134, 121. ¹H-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 2.23 (3H, s), 2.58 (3H, s), 3.67 (3H, s), 5.15 (1H, dd, $J = 2$ und 10 Hz), 5.63 (1H, dd, $J = 7$ und 9 Hz), 6.95 (2H, d, $J = 9$ Hz), 7.47 (2H, d, $J = 9$ Hz). ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 160.6 (s, C-4'), 155.2, 153.3, 152.9 (je s, eins von C-5, C-7 und C-9), 135.2 (s, C-1'), 128.3 (d, C-2'), 128.3 (d, C-6'), 114.8 (d, C-3'), 114.8 (d, C-5'), 105.3, 104.8, 104.0 (je s, eins von C-6, C-8 und C-10), 73.8 (d, C-2), 70.5 (d, C-4), 55.7 (q, arom. -OCH₃), 35.3 (t, C-3), 8.9, 8.5 (je q, arom. -CH₃). 40 mg 4,5,7-Trihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylflavan in 2 ml MeOH wurden mit 2 ml 3 proz.

Salzsäure 5 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt. 7 mg 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin wurden erhalten. Die physikalischen und spektroskopischen Daten stimmten mit denen von V überein.

Tetraacetyleruberin A—30 mg Eruberin A in 2 ml Pyridin wurden mit 2 ml Ac₂O eine Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurde durch Säulenchromatographie (7 g Kieselgel, CHCl₃) gereinigt. Farbloses Pulver. MS: *m/z* 628.2176 (M⁺ für C₃₂H₃₆O₁₃, Ber. 628.2156), 494, 452, 392, 341, 340, 299, 298, 191, 134, 121, 43. ¹H-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ: 2.03 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.14 (3H, s), 2.19 (3H, s), 2.32 (3H, s), 2.38 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.78 (1H, t, *J*=9 Hz), 3.9–4.2 (1H, m), 4.42 (2H, verbreitertes s), 4.78 (1H, dd, *J*=3 und 12 Hz), 5.02 (1H, d, *J*=3 Hz), 5.30 (1H, t, *J*=9 Hz), 5.54 (1H, d, *J*=8 Hz), 5.72 (1H, t, *J*=9 Hz), 7.03 (2H, d, *J*=8 Hz), 7.47 (2H, d, *J*=8 Hz). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 170.5 (s), 170.0 (s), 169.4 (s), 168.4 (s), 159.5 (s), 151.7 (s), 149.5 (s), 149.3 (s), 132.4 (s), 127.2 (d), 127.2 (d), 115.7 (s), 115.2 (s), 114.0 (d), 114.0 (d), 109.1 (s), 100.5 (d), 73.8 (d), 73.0 (d), 72.5 (d), 72.3 (d), 68.4 (d), 65.8 (d), 61.8 (t), 55.2 (q), 37.0 (t), 20.7 (q), 20.5 (q), 20.4 (q), 9.3 (q), 9.1 (q).

Permethylierung von I—Nachdem 5 ml DMSO und 500 mg 50 proz. NaH 1.5 h unter N₂-Atmosphäre bei 70 °C gerührt worden waren, fügte man die Lösung von 9.5 mg I in 4 ml DMSO hinzu und rührte 1 h unter Luftabschluß. Nach üblicher Aufarbeitung wurde das Reaktionsprodukt durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt. 6 mg Tetramethyläther (VIII) wurden als farbloses Pulver erhalten. ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃) δ: 2.12 (3H, s), 2.17 (3H, s), 3.40 (3H, s), 3.48 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.68 (3H, s), 3.81 (3H, s), 6.90 (2H, d, *J*=9 Hz), 7.35 (2H, d, *J*=9 Hz).

Methanolyse von VIII—6 mg Tetramethyläther (VIII) in 2 ml 5 proz. methanolischer Salzsäure wurden 5 h unter Rückfluß erhitzt. Nach üblicher Aufarbeitung wurde das Reaktionsprodukt an Kieselgel (10 g) chromatographiert (Benzol-CHCl₃-CHCl₃/Äther (20:1)). 2.5 mg Methylglykosid wurden erhalten und durch ¹H-NMR- und Massenspektrum sowie Vergleichsgaschromatographie mit authentischen Methylglukosiden. *t_R*: 3.5 min. (Methyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-D-glukosid⁵) *t_R*: 3.5 min, Methyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-D-glukosid⁶) *t_R*: 3.4 und 4.6 min, Methyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-D-glukosid⁷) *t_R*: 2.7 und 3.7 min, Methyl 2,4,6-tri-*O*-methyl-D-glukosid⁸) *t_R*: 3.2 und 4.5 min (30 m-Kapillarsäule (i.d. 0.25 mm), WCOT, OV-17, Säulentemperatur: 149 °C, Träger-Gas: N₂). Methyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-D-glukosid—MS *m/z* 204, 173, 161, 101, 88, 75, 71, 45. ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃) δ: 3.41 (6H, s), 3.52 (3H, s), 3.64 (3H, s), 4.74 (1H, d, *J*=4 Hz).

Behandlung von I mit Essigsäure—30 mg I wurden in 95 proz. Essigsäure 1 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abdestillieren der Essigsäure wurde der Rückstand durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, CHCl₃-MeOH, 4:1) gereinigt. 7 mg Anthocyanidin-Glukosid (VI) wurden erhalten. 7-Hydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin-5-*O*-D-glukosid—Rotes Pulver. UV λ_{max}^{0.01% HCl/MeOH} nm (log ε): 244 (4.09), 278 (4.30), 331 (3.79), 472 (4.65). ¹H-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.08 (3H, s, arom. CH₃), 2.10 (3H, s, arom. CH₃), 3.85 (3H, s, arom. OCH₃), 4.60 (1H, d, *J*=8 Hz, arom. Proton), 7.08 (2H, d, *J*=8 Hz, 3'-H und 5'-H), 7.20 (1H, d, *J*=8 Hz, 4-H), 7.96 (2H, d, *J*=8 Hz, 2'-H und 6'-H), 8.19 (1H, d, *J*=8 Hz, 3-H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 181.8 (s), 161.8 (s), 157.8 (s), 153.2 (s), 150.2 (s), 134.5 (d), 127.5 (d), 127.5 (d), 127.1 (s), 123.1 (s), 117.0 (s), 114.7 (d), 114.7 (d), 107.9 (s), 104.9 (d), 101.5 (d), 76.9 (d), 76.3 (d), 73.9 (d), 69.7 (d), 60.9 (t), 55.4 (q), 10.7 (q), 7.8 (q).

Enzymatische Hydrolyse von VI—2 mg VI in 2 ml Acetat-Puffer-Lösung (pH 5.0) wurden mit 5 mg β-Glukosidase versetzt und 48 h bei 35 °C gerührt. 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin (V) und D-Glukose wurden dünnschichtchromatographisch identifiziert.

Eruberin B (II)—Kristallisiert aus CHCl₃-MeOH. Farblose Nadeln vom Schmp. 173–177 °C (Zers.) und [α]_D²⁰ + 10.0° (*c*=1.0, MeOH). C₃₀H₄₀O₁₅: Ber. C, 56.24; H, 6.29. Gef. C, 56.10; H, 6.18. UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε) 225.5 (4.50), 276.5 (3.69), 282 (3.69). IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3350, 2930, 1610, 1520, 1260, 1160, 840. MS *m/z*: 460 (3%, M⁺ - C₆H₁₂O₆), 298 (68%, C₁₈H₁₈O₄), 297 (100%, C₁₈H₁₇O₄), 296 (45%), 267 (12%), 191 (12%), 166 (50%), 134 (35%), 121 (28%). ¹H-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ: 2.65 (3H, s, arom. CH₃), 3.12 (3H, s, arom. CH₃), 3.68 (3H, s, arom. OCH₃), 6.98 (2H, d, *J*=9 Hz, 3'-H und 5'-H), 7.48 (2H, d, *J*=9 Hz, 2'-H und 6'-H).

Saure Hydrolyse von II—20 mg II wurden in 5 ml 3 proz. Salzsäure 4 h erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert. 3 mg 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin (V) wurden erhalten. Das mit BaCO₃ neutralisierte Filtrat wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand nach Trimethylsilylierung der Gaschromatographie unterworfen. D-Glukose wurde identifiziert.

Permethylierung von II—30 mg II wurden wie im Falle von I nach Hakomori permethyliert. Das Reaktionsprodukt wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, CHCl₃-MeOH) gereinigt. 30 mg Permethyläther (IX) wurden erhalten. Farbloses Pulver. IR ν_{max}^{CHCl₃} cm⁻¹: 2940, 1600, 1520, 1460, 1380, 1260, 1095, 840. MS *m/z*: 298, 297 (100%), 296, 267, 218, 187. ¹H-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 2.14 (3H, s), 2.24 (3H, s), 3.00–4.00 (m), 4.44 (1H, d, *J*=8 Hz), 4.49 (1H, d, *J*=8 Hz), 4.81 (1H, tripletartiges s), 5.27 (1H, dd, *J*=2 und 12 Hz), 6.87 (2H, d, *J*=9 Hz), 7.33 (2H, d, *J*=9 Hz).

Methanolyse von IX—25 mg Permethyläther IX in 5 proz. methanolischer Salzsäure wurden 2 h unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne eingengt und der Rückstand der Säulenchromatographie (Kieselgel, CHCl₃-MeOH) unterworfen. Die mit CHCl₃ eluierten Fraktionen ergaben 13.5 mg Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glukosid, das durch Gaschromatographie identifiziert wurde. *t_R*: 6.5 und 7.5 min (30 m-Kapillarsäule (i.d. 0.25 mm), WCOT, SE-30, Säulentemperatur: 130 °C). Die mit CHCl₃-MeOH eluierten Fraktionen lieferten 2.5 mg

5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin (V), das mittels IR-Spektrums identifiziert wurde.

Enzymatische Hydrolyse von II mit Rohhesperidinase—15 mg Eruberin B(II) in 2 ml Acetat-Puffer-Lösung (pH: 3.8) wurden mit 20 mg Rohhesperidinase versetzt und 24 h bei 35°C gerührt. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, CHCl₃-MeOH (6:1)) aufgetrennt. Neben D-Glukose und einer kleinen Menge von 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin wurden 5 mg Eruberin A (I) erhalten, das durch optische Drehung und ¹³C-NMR-Spektrum identifiziert wurde.

Eruberin C (III)—Kristallisiert aus CHCl₃-MeOH. Farblose Nadeln vom Schmp. 154—159°C (Zers.) und $[\alpha]_D^{20} -2.6^\circ$ ($c=0.7$, MeOH). C₃₁H₄₂O₁₅: Ber. C, 56.87; H, 6.47. Gef. C, 56.76; H, 6.40. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 226 (4.42), 276.5 (3.58), 282 (3.58). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3350, 2930, 1610, 1520, 1260, 1160, 840. MS m/z : 298 (100%, C₁₈H₁₈O₄), 297 (80%, C₁₈H₁₇O₄), 296 (40%), 267 (17%), 191 (17%), 166 (20%), 134 (13%), 121 (17%). ¹H-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 2.62 (3H, s, arom. CH₃), 3.08 (3H, s, arom. CH₃), 3.68 (6H, s, arom. OCH₃), 6.98 (2H, d, $J=8$ Hz, 3'-H und 5'-H), 7.43 (2H, d, $J=8$ Hz, 2'-H und 6'-H). ¹H-NMR (60 MHz, CD₃OD) δ : 2.14 (3H, s, arom. CH₃), 2.33 (3H, s, arom. CH₃), 3.49 (3H, s, aliph. OCH₃), 3.80 (3H, s, arom. OCH₃), 6.94 (2H, $J=8$ Hz, 3'-H, 5'-H), 7.38 (2H, d, $J=8$ Hz, 2'-H und 6'-H).

Saure Hydrolyse von III—5 mg Eruberin C (III) wurden in 2 ml 3 proz. Salzsäure 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, der mit Dünnschichtchromatographie als 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylanthocyanidin identifiziert wurde. Das Filtrat wurde nach der üblichen Aufarbeitung gaschromatographisch untersucht, und D-Glukose war nachweisbar.

Überführung von II zu III—30 mg Eruberin B (II) wurden in 3 ml CH₃COOH-MeOH (1:4, v:v) 5 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand der präparativen Dünnschichtchromatographie (CHCl₃-MeOH-H₂O, 35:15:1) unterworfen, und 20 mg Eruberin C (III) wurden erhalten.

Permethylierung von III—7.5 mg Eruberin C (III) wurden wie im Falle von I nach Hakomori permethyliert. Die Reaktionsmischung wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie (CHCl₃-Äther, 2:1) aufgetrennt. 5 mg Permethyläther wurden erhalten, dessen IR- und ¹³C-NMR-Spektren mit denjenigen von IX übereinstimmten.

Afzelin(Kaempferol-3-O- α -L-rhamnosid)—Kristallisiert aus MeOH-H₂O. Gelbe Nadeln vom Schmp. 171—175°C und $[\alpha]_D^{20} -157.6^\circ$ ($c=1.5$, MeOH). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 266 (4.33), 344 (4.17). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3300, 1660, 1610, 1500, 1360, 1180, 840. MS m/z : 286 (100%), 258, 229, 153, 121, 69. ¹H-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.82 (3H, d, $J=4$ Hz), 3.0—4.1 (4H, m), 5.30 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.24 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.46 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.93 (2H, d, $J=9$ Hz), 7.73 (2H, d, $J=9$ Hz).

Quercitrin(Quercetin-3-O- α -L-rhamnosid)—Kristallisiert aus MeOH. Gelbe Nadeln vom Schmp. 201—203°C und $[\alpha]_D^{20} -159.4^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 257 (4.36), 264 (4.33, Schulter), 350 (4.21). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3300, 1660, 1610, 1500, 1360, 1200, 1180, 1000, 810. MS m/z : 302 (100%), 273, 153, 137, 128. ¹H-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.86 (3H, d, $J=5$ Hz), 3.2—4.1 (4H, m), 5.28 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.21 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.40 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.87 (1H, d, $J=8$ Hz), 7.26 (1H, dd, $J=2$ und 8 Hz), 7.31 (1H, verbreitertes s).

Danksagung Für die Förderung eines Teils dieser Arbeit sei dem Ministerium für Erziehung—Grant-in-Aid for Scientific Research 1982 (No. 56570731)—gedankt.

Literatur und Anmerkungen

- 1) T. Kuraishi, T. Taniguchi, K. Hori, T. Murakami, N. Tanaka, Y. Saiki und C.-M. Chen, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 4409 (1983).
- 2) E. Halsam, "The Flavonoids: Advances in Research," herausgegeben von J. B. Harborne and T. J. Marby, Chapman and Hall, London and New York, 1982, S. 417.
- 3) S. Fujise, *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res.*, **11**, 111 (1929).
- 4) E. C. Bate-Smith and T. Swain, *Nature* (London), **213**, 1033 (1967); E. C. Bate-Smith and V. Rasper, *J. Food Sci.*, **34**, 203 (1969).
- 5) Methyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-D-glukosid wurde ausgehend von Pinocembrin-7-neohesperidosid dargestellt.
- 6) Methyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-D-glukosid wurde ausgehend von Maltose dargestellt.
- 7) Methyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-D-glukosid wurde ausgehend von Rutin dargestellt.
- 8) Durch Umsetzung der D-Glukose mit Aceton und konz. H₂SO₄, Benzylierung und anschließende Hydrolyse mit Salzsäure wurde Methyl-3-*O*-benzyl-D-glukosid erhalten, das nach Permethylierung und Hydrogenolyse in Methyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-D-glukosid übergeführt wurde.