

HEINZ RÖSLER *), TOM J. MABRY und JACQUES KAGAN

**Sphaerobiosid, ein Isoflavonglykosid aus
*Baptisia sphaerocarpa***

Aus dem Cell Research Institute and Department of Botany,
The University of Texas, Austin, USA

(Eingegangen am 22. Januar 1965)

Ein neuer Isolierungsgang von allgemeiner Anwendbarkeit für phenolische Naturstoffe führte zur Auffindung des Genistein-7-rutinosids in *Baptisia sphaerocarpa*. Die Struktur dieses bisher noch nicht beschriebenen Glykosids wurde aus dem Kernresonanzspektrum erkannt. Sie ließ sich durch Überführung des Aglykons in bekannte Methoxy-isoflavone sowie durch gaschromatographische Analyse des silylierten Zuckeranteils bestätigen.

Ein ansehnlicher Teil der über 50 in der Leguminosengattung *Baptisia* nachweisbaren Flavonoide wurde bereits aufgeklärt¹⁾. Es war uns jedoch bisher nicht möglich, ein in der Spezies *Baptisia sphaerocarpa* in geringer Menge vorkommendes Glykosid zu isolieren, das sich aufgrund UV-spektroskopischer Daten und analytischer Kriterien als Isoflavonderivat auswies. Ein neuartiges Isolierungsverfahren erlaubte uns schließlich eine wesentliche Voraussetzung für die Gewinnung dieser Substanz zu schaffen. Es besteht in der Fraktionierung der vorhandenen Flavonoide unter gleichzeitiger Beseitigung aller nichtaromatischen Ballaststoffe. Die Aromaten fraktionierten wir durch Adsorption an Aktivkohle, ein Verfahren, das von A. ASATOOR und C. E. DALGLIESH²⁾ für die Abtrennung von Indolverbindungen aus Urin beschrieben wurde. Abgesehen von orientierenden Vorversuchen mit aromatischen Naturstoffen unterschiedlicher Struktur, die uns die vielseitige Brauchbarkeit der Methode erkennen ließen, konnten wir am Beispiel unseres *Baptisia*-Extraktes beobachten, daß die Adsorption der Flavonoide in der zu erwartenden Reihenfolge: Aglykone, Monoglykoside, Diglykoside usw. stattfindet. Das Sphaerobiosid ließ sich zusammen mit anderen Flavonoid-diglykosiden mit phenolgesättigtem Wasser von der Kohle desorbieren^{**)}.

Nach Behandlung mit Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan lieferte *Sphaerobiosid* (Ia) einen tetrachlorkohlenstofflöslichen Octa-trimethylsilyl-äther³⁾, dessen Kernresonanzspektrum für das Aglykon die Struktur des 5.7.4'-Trihydroxyisoflavons *Genistein* (Ib) sicherstellte.

*) Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Univ. München, z. Zt. beurlaubt.

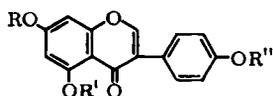
**) Aus der gleichen Fraktion wurden außerdem noch ein Quercetin-3.7-diglucosid sowie ein Luteolin-7-rutinosid isoliert, deren endgültiger Strukturwies noch nicht abgeschlossen ist.

1) T. J. MABRY, J. KAGAN und H. RÖSLER, *Phytochemistry* 4, [1965], im Druck.

2) *J. chem. Soc. [London]* 1956, 2291.

3) T. J. MABRY, J. KAGAN und H. RÖSLER, *Phytochemistry* 4, 177 [1965].

Bei der Hydrolyse des Sphaerobiosids erhielten wir neben *Genistein* Glucose und Rhamnose, die gaschromatographisch in Form der flüchtigen Trimethylsilyl-Derivate^{4,5)} mit jeweils 2 Signalen (α - und β -Form) deutlich getrennt wurden.



Ia-d

- a: R = Rhamnoglucosyl, R' = R'' = H
 b: R = R' = R'' = H
 c: R = H, R' = R'' = CH₃
 d: R = R' = H, R'' = CH₃

Der Nachweis, daß die beiden Zucker im Sphaerobiosid in Form der 6-[α -L-Rhamno-
sido]-D-glucose *Rutinose* vorliegen, ergab sich eindeutig aus den Kernresonanzdaten. Ein breites Signal bei $\tau = 5$ kann als typisch für ein axial-axial gekoppeltes Proton am C-1 eines Zuckers angesehen werden, welcher entweder mit dem Hydroxyl an C-7 oder C-4' eines Flavonoids verknüpft ist^{1,6)}. Aufgrund dieser Kopplung ist darüber hinaus eine β -Glykosidverknüpfung zu fordern. Der Signalbereich zwischen $\tau = 6.0$ bis 6.67 (10 Protonen) bestätigt das Vorhandensein zweier Monosen. Ein Signal bei $\tau = 9.05$ (3 Protonen) ist für die Methylgruppe der Rhamnose in Rutinosiden charakteristisch^{1,3,7)}. Weiterhin zeigt das dem C-1-Proton der Rhamnose zugehörige Signal bei $\tau = 5.58$ an, daß die Rhamnose der terminale Zucker ist⁶⁾. Auch die chemische Verschiebung dieses Signals läßt sich mit den Signalen authentischer Rutinoside von Flavonoiden zur Deckung bringen. Die Neohesperidose, als bisher einzige neben *Rutinose* in Flavonglykosiden festgestellte Rhamnoglucose, kann im NMR-Spektrum deutlich von dieser unterschieden werden.

Eine eindeutige Aussage über die Struktur des Disaccharids läßt sich außerdem aus dem NMR-Spektrum des Sphaerobiosidacetats ableiten.

Hier waren diejenigen 6 Protonen, die C-Atomen mit acetyliertem Hydroxyl zugehörig sind, deutlich von $\tau = 6.00$ –6.67 (Zuckersignal im Octa-trimethylsilyl-äther) nach $\tau = 4.6$ –5.17 verschoben, während die 4 Protonen an den C-Atomen 5 der Rhamnose und 5 und 6 der Glucose nach wie vor zwischen $\tau = 5.83$ –6.67 erschienen. Dieses Verhältnis von 7 (6 + 1, da auch das Proton am C-1 der Glucose in diesem Bereich erscheint) zu 4 Protonen kann nur für eine glykosidische Bindung der Rhamnose an C-6 der Glucose gelten, wie es in der *Rutinose* der Fall ist. Sämtliche anderen Rhamnoglucoside lassen ein Protonenverhältnis von 6 : 5⁷⁾ erwarten. Der Ort der Zuckersubstitution konnte durch Darstellung zweier Methyläther des *Genisteins* festgelegt werden. Das für die NMR-Analyse eingesetzte Octa-trimethylsilyl-Derivat stellte aufgrund seiner Löslichkeit in Aceton eine ausgezeichnete Ausgangsverbindung für die Totalmethylierung des Glykosids dar. Im Verlaufe dieser Reaktion wurden die

4) C. C. SWEELEY, R. BENTLEY, M. MAKITA und W. W. WELLS, J. Amer. chem. Soc. **85**, 2497 [1963].

5) J. KAGAN und T. J. MABRY, Analytic. Chem. **37**, 288 [1965].

6) T. J. MABRY, J. KAGAN und H. RÖSLER, The University of Texas, Publication Nr. 6418 [1964].

7) H. RÖSLER, T. J. MABRY, M. CRANMER und J. KAGAN, in Vorbereitung.

Trimethylsilylreste an den zu methylierenden Hydroxylen abgespalten. Nach anschließender Hydrolyse erhielten wir das bei 293–294° schmelzende 5.4'-Dimethylgenistein (Ic) (5.7-Dimethylgenistein schmilzt bei 264°⁸⁾).

Die partielle Methylierung⁹⁾ des Sphaerobiosids lieferte nach Hydrolyse das 5.7-Dihydroxy-4'-methoxy-isoflavon Biochanin A (Id).

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit sind wir den NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA (Grants Nr. GM-11111-02 und 02S1) zu Dank verpflichtet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Kernresonanzdaten wurden mit einem Varian A-60-Gerät ermittelt. Alle Schmelzpunkte wurden mit der Fisher-Johns-Apparatur bestimmt und sind unkorrigiert.

Isolierung von Sphaerobiosid (Ia): 150 g Aktivkohle wurden auf der Nutsche zuerst mit 1 l 5-proz. Phenollösung in 2n HCl und anschließend mit Wasser gewaschen. Zur weiteren Reinigung saugten wir je 1/2 l 2n NaOH, Wasser, 2n HCl sowie schließlich 2 l Wasser durch die Kohle, die nun in 1 l eines in üblicher Weise aus 500 g getrockneten Blüten von *Baptisia sphaerocarpa* hergestellten wäbr. Extraktes suspendiert wurde. Nach 1/2 Stde. saugten wir ab, wuschen mit 1 l Wasser nach und behandelten das gesamte Filtrat abermals in der gleichen Weise mit vorgereinigter Kohle. Diese Kohlefraktion wuschen wir nacheinander mit 4 l Wasser und 1.5 l Methanol und extrahierten anschließend die Flavonoide mit 1 l einer gesätt. Lösung von Phenol in Wasser (7-proz.). Den mittels Äther von Phenol befreiten Extrakt engten wir bei 40° i. Vak. bis zur Sirupkonsistenz ein. Beim Verdünnen des Sirups mit 200 ccm Methanol fiel ein flockiger Niederschlag aus, den wir verwarfen. Die eingeengte methanol. Lösung wurde nun über eine Polyamidsäule (10 × 6 cm) mit Methanol/Chloroform (1:2) chromatographiert. Das *Sphaerobiosid* fand sich in der ersten eluierten Fraktion. Aus Methanol 0.6 g farblose, fädige Kristalle, die in Methanol mit Eisen(III)-chlorid einen schmutzigen roten Komplex liefern, bei 202° zu sintern beginnen und bei 204° schmelzen. $[\alpha]_D^{20}$: -71° ($c = 10.44$ in Pyridin). λ_{\max} (in absol. Äthanol) 326 m μ ($\log \epsilon = 3.73$), 261 (4.59).

$C_{27}H_{30}O_{14} \cdot \frac{1}{2} H_2O$ (587.5) Ber. C 55.20 H 5.32 Gef. C 55.17 H 5.55

Octa-trimethylsilyl-sphaerobiosid: Wir versetzten eine Lösung von 0.1 g *Sphaerobiosid* in 15 ccm Pyridin mit je 0.2 ccm *Hexamethyldisilazan* und *Trimethylchlorosilan* und destillierten die überschüss. Reagentien nach 30 Min. bei 50°/0.25 Torr ab. Der Rückstand wurde mit Tetrachlorkohlenstoff extrahiert und die Lösung nach Filtrieren eingeengt. Es verblieb ein Sirup, von dem wir in 0.3 ccm Tetrachlorkohlenstoff das NMR-Spektrum aufnahmen.

Chemische Verschiebungen τ (relativ zu TMS als inneren Standard):

A-Ring: H-8: 3.43, d (J_{meta} 2.5 Hz), H-6: 3.67, d (J_{meta} 2.5 Hz); *B-Ring*: H-2', H-6': 2.64, d (J_{ortho} 8.5 Hz), H-3', H-5': 3.21, d (J_{ortho} 8.5 Hz); *C-Ring*: H-2: 2.37; Rhamnoglucosyl-, Glucose H-1: 5.05, breit; Rhamnose H-1: 5.85, Rhamnose CH₃: 9.05, breit, 10 Protonen: 6.0–6.67.

Octaacetyl-sphaerobiosid: 80 mg *Sphaerobiosid* wurden in üblicher Weise acetyliert. Farblose kräftige Nadeln vom Schmp. 209–210° (aus Methanol).

Acetyl aus dem NMR-Spektrum (in CDCl₃, int. TMS): 7.63 (3 Protonen), 7.73 (3), 7.84 bis 8.17 (18).

⁸⁾ R. BOGNAR, Magyar Kém. Lapja 4, 519 [1949], C. A. 46, 8104 [1952].

⁹⁾ G. ZEMPLÉN und L. FARKAS, Chem. Ber. 90, 836 [1957].

Hydrolyse

a) *Genistein (Ib)*: Eine Lösung von 30 mg *Sphaerobiosid* in 1.2 ccm konz. *Salzsäure* wurde auf 15 ccm verdünnt. Nach 2stdg. Erhitzen hatte sich das Aglykon aus der heißen Lösung abgeschieden. Schmp. 291–292°, Misch-Schmp. mit authent. *Genistein* ohne Depression. Das IR-Überlagerungsspektrum (in Mineralöl) bestätigte die Identität.

b) *Zucker*: Das nach a) erhaltene Filtrat wurde bei 20°/0.25 Torr zur Trockene gebracht. Den Rückstand silylierten wir, wie beim *Sphaerobiosid* beschrieben. Die Mischung der Trimethylsilyl-äther wurde in Heptan gaschromatographiert. Retentionszeiten: 3.7 Min. (α -*Rhamnose*), 4.8 Min. (β -*Rhamnose*), 9.7 Min. (α -*Glucose*), 13.9 Min. (β -*Glucose*). Das Gaschromatogramm entsprach den unter gleichen Bedingungen mit authent. *Glucose* und *Rhamnose* in äquimol. Verhältnis erhaltenen Werten. (Gerät: Research Specialties Co. B 600, 1.83 m \times 6 mm-Säule, 3% SE 52 auf 80/100 Chromosorb W, säuregewaschen*), Argon, 1.2 at).

7-Hydroxy-5,4'-dimethoxy-isoflavon (Ic): Das für die NMR-Analyse hergestellte *Octa-trimethylsilyl-sphaerobiosid* lösten wir in 30 ccm Aceton und methylierten mit *Dimethylsulfat* und Kaliumcarbonat in üblicher Weise. Nach anschließender Hydrolyse erhielten wir *Ic*, aus Methanol Schmp. 293–294° (Lit.: 294°¹⁰), 291–292°¹¹). Die Eisen(III)-chlorid-Reaktion in Methanol war negativ. CH₃O: Im NMR (Trimethylsilyläther in CCl₄, int. TMS) 2 scharfe Singulets bei $\tau = 6.12$ und 6.21 (jeweils 3 Protonen).

5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-isoflavon, Biochanin A (Id): Die partielle Methylierung nach G. ZEMPLÉN und L. FARKAS mit *Methyljodid* in Methanol in Gegenwart von Kaliumcarbonat⁹) lieferte aus 200 mg *Sphaerobiosid* nach Hydrolyse 53 mg *Id* vom Schmp. 213–215° (Methanol). Misch-Schmp. mit authent. Verbindung ohne Depression. Die Eisen(III)-chlorid-Reaktion war positiv. CH₃O: Im NMR (Bis-trimethylsilyl-äther in CCl₄, int. TMS) 1 scharfes Singulett bei $\tau = 6.23$ (3 Protonen).

*) Applied Science Laboratories, Inc., P. O. Box 140, State College, Pa., USA.

¹⁰) F. E. KING und L. JURD, J. chem. Soc. [London] 1952, 3211.

¹¹) R. BOGNAR und V. SCABO, Acta chim. Acad. Sci. hung. 4, 383 [1954], C. A. 49, 6130 [1955].