

Ludwig Hörhammer, Hildebert Wagner, Hans Krämer und Lóránd Farkas

Untersuchungen über Isorhamnetinglykoside, II^{1,2)}

Isolierung und Konstitutionsaufklärung neuer Glykoside von *Brassica napus* L. und *Sinapis arvensis* L.

Aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München und aus der Forschungsgruppe für Alkaloidchemie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Technische Universität Budapest

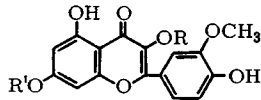
(Eingegangen am 2. Februar 1967)

Aus den Blüten von *Brassica napus* L. und *Sinapis arvensis* L. wurden neben anderen Flavonolglykosiden zwei bisher unbekannte Isorhamnetinglykoside, Isorhamnetin-3- β -[2-O- β -glucopyranosyl-D-glucosid]-7-mono- β -D-glucosid (Brassicosid) (**1a**) und Isorhamnetin-3-mono- β -glucosid-7-mono- α -L-rhamnosid (Brassicidin) (**1c**), isoliert.

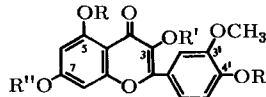
In den Blütenextrakten von *Brassica napus* L. subsp. *oleifera* (DC.) Metzger var. *biennis* Metzger (Winterraps) lassen sich dünnschichtchromatographisch vier, in *Sinapis arvensis* L. (Ackersenf) zwei Flavonolglykoside nachweisen. Ihre Isolierung gelang durch Kombination klassischer und chromatographischer Verfahren. Eines der Glykoside aus *Brassica napus* (**1a**), das wir *Brassicosid* nennen, hat einen Schmelzpunkt von 209–212° und gibt bei der Hydrolyse 1 Mol Isorhamnetin und 3 Mol Glucose. Nach dem Ergebnis der Methylierung kommen als Zuckerhaftstellen nur C-3 und C-7 in Frage. Da man durch partielle Hydrolyse mit 0.1-proz. Salzsäure neben anderen Spaltprodukten als Hauptanteil Isorhamnetin-7-mono- β -D-glucosid (**1b**) und ein Disaccharid (Glucosyl-glucose) erhält, müssen zwei Glucosereste hintereinander an die C-3-OH-Gruppe gebunden sein. Die Struktur des Disaccharides wurde auf elektrophoretischem Wege geklärt. Das Disaccharid wandert in Boratpufferlösung wie alle 1.2- und 1.4-Glucosyl-glucosen zur Kathode und verhält sich wie authentische *Sophorose*. Nach Reduktion mit Natriumborhydrid hat der Zuckeralkohol gleiche Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit wie authentisches *Sophorit*ol. Die Struktur des Isorhamnetin-7- β -D-glucosids wurde durch Methylierung und anschließende Hydrolyse zum 3.5.4'-Trimethyl-isorhamnetin sowie durch quantitative Hydrolyse des Glucosids bestimmt. Dieses Monoglucosid (Brassicin), bisher ebenfalls noch nicht bekannt, ist auch frei in den Blütenextrakten nachweisbar. Somit muß dem *Brassicosid* die Struktur **1a** eines Isorhamnetin-3- β -[2-O- β -glucopyranosyl-D-glucosid]-7-mono- β -D-glucosids zukommen.

1) Vorläufige Mitteil.: L. Hörhammer, H. Wagner, H. G. Arndt und H. Krämer, *Tetrahedron Letters* [London] 6, 567 (1966).

2) I. Mitteil.: L. Hörhammer, H. Wagner, H. G. Arndt und L. Farkas, *Chem. Ber.* 99, 1384 (1966).



	R	R'
1a	Sophorosyl	Glucosyl
b	H	Glucosyl
c	Glucosyl	Rhamnosyl
d	Glucosyl	H
e	H	Rhamnosyl



	R	R'	R''
2a	H	H	H
b	CH ₃	H	H
c	CH ₃	CH ₃	H

Ein zweites Glycosid (**Brassidin**) (**1c**) aus den Blüten von *Sinapis arvensis* schmilzt bei 222–224° und wurde durch Säure in 1 Mol Isorhamnetin, 1 Mol Glucose und 1 Mol Rhamnose gespalten. Der durch Methylierung des Glykosids und nachfolgende Hydrolyse erhaltene Isorhamnetin-5.3'.4'-trimethyläther beweist, daß die beiden Zucker getrennt voneinander an das C-3- und C-7-Hydroxyl geknüpft sind. Nach partieller Hydrolyse isoliert man aus dem Hydrolyseansatz Isorhamnetin-3-mono-glucosid (**1d**), das mit dem synthetischen Glykosid im Schmelzpunkt übereinstimmt (Schmp. 175 bis 177°¹⁾) und Isorhamnetin-7-mono-rhamnosid (**1e**) vom Schmp. 248–250°, das bisher noch nicht bekannt war. Seine Struktur wurde auf dem üblichen Wege geklärt. Für das Brassidin kann demnach die Struktur **1c** eines Isorhamnetin-3-mono-β-D-glucosid-7-mono-α-L-rhamnosids geschrieben werden.

Nach Abschluß unserer Arbeiten wurde von *Krug* und *Borkowski*³⁾ über die Isolierung eines Isorhamnetin-3.7-glucorhamnosids (**Boldosid**) aus *Peumus Boldus* mit Schmp. 214.5–216° berichtet. Da Zuckerart und Zuckerverknüpfung in diesem Glykosid nur mit UV-Spektren und durch Papierchromatographie festgestellt wurden, ist eine Identität mit Brassidin unsicher.

Über die Isolierung und Struktur der anderen Glykoside berichteten wir in einem anderen Zusammenhang.

Wir danken dem *Fonds der Chemie* und der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für Sachbeihilfen.

Professor L. Farkas (Budapest) dankt der *Deutschen Akademischen Auslandsstelle* für ein Forschungsstipendium.

Beschreibung der Versuche⁴⁾

Isolierung von Brassicosid (1a) aus Brassica napus: 6.8 kg getrocknete Rapsblüten (*Brassica napus* var. *napus* f. *biennis*) wurden im Siccotopf bei 1.5–2 atü dreimal mit Methanol ausgezogen. Die vereinigten Methanollösungen wurden vom Lösungsmittel befreit, der zähflüssige Rückstand mit 1.5l heißem Wasser in eine Abdampfschale gespült und mehrere Stdn. auf dem Wasserbad digeriert. Vom ausgefallenen Chlorophyll und den Ballaststoffen wurde heiß abfiltriert und die Lösung mit Wasser verdünnt. Diesen Prozeß wiederholten wir mehrmals, ließen den Extrakt über Nacht im Eisschrank stehen und filterten erneut von den ausgefallenen Ballaststoffen ab. Wir brachten die Lösung mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 6.0

³⁾ *H. Krug* und *B. Borkowski*, *Pharmazie* **20**, 692 (1965).

⁴⁾ Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Die UV-Spektren wurden mit dem Zeiss-Opton-Spektralphotometer PM Q 2 aufgenommen.

und schüttelten sie zuerst mehrmals mit Chloroform und dann mit Äther bis zur Farblosigkeit des Lösungsmittels aus. Anschließend wurde mit Äthylacetat im Perforator erschöpfend extrahiert; die Äthylacetatphasen wurden zur Isolierung anderer Glykoside aufgearbeitet.

Nach 14-tägigem Stehenlassen des auf diese Weise vorbehandelten wäbr. Extraktes hatte sich ein gelber, amorpher Niederschlag abgeschieden, der zwei Glykoside enthält. Insgesamt wurden 9 g Mischkristallat erhalten. Eine weitere Menge wurde durch Ausschütteln der Restlösung mit Butanol und Abdestillieren des Lösungsmittels gewonnen. Zur Reinigung des Mischkristallates von Harzbestandteilen wurden 5 g an einer 6.5×65 -cm-Perlonsäule⁵⁾ mit 90-proz. Methanol chromatographiert. Die Trennung des gereinigten Mischkristallates (1.5 g) erfolgte an einer Kieselgelsäule (4.5×15 cm) mit Äthylacetat/Methanol/Wasser (100 : 16.5 : 13.5). Die beiden Glykoside trennten sich erst im unteren Teil der Säule.

Brassicosid (1a) fiel aus wäbr. Lösung in kleinen Kugeln an. Es erstarrte glasartig bei 193 bis 195°, sinterte bei 202–204° und schmolz bei 209–212°. Das Glykosid kristallisiert mit 3 Moll. H₂O und verliert davon bei 140° i. Hochvak. 2 Moll. (Ber. 4.29%, Gef. 4.18%).

UV in Methanol: λ_{\max} (log ϵ) 255 (4.35), 357 m μ (4.23).

C₃₄H₄₂O₂₂ · 1 H₂O (820.7) Ber. C 49.76 H 5.41 Gef. C 49.84 H 5.35

a) Quantitative Hydrolyse des Glykosids mit 10-proz. Salzsäure lieferte 39.3% Isorhamnetin (2a) (ber. 39.1%) vom Schmp. 304–305°. Das Tetraacetat (Schmp. 206–208°) gab mit authent. Isorhamnetin-tetraacetat keine Depression.

In der Hydrolyselösung war nur Glucose nachweisbar. Das erhaltene Osazon (Schmp. 206–208°) gab mit authent. Glucosazon keine Depression.

b) 3,7-Dihydroxy-5,3',4'-trimethoxy-flavon (5,3',4'-Trimethyl-quercetin) (2b): Methylierung von 1a mit Dimethylsulfat nach Zemplén, Bogнар und Farkas⁶⁾ und nachfolgende Hydrolyse mit 10-proz. Salzsäure führte zum Quercetin-5,3',4'-trimethyläther (2b) vom Schmp. 292 bis 294° (Lit.⁷⁾: Schmp. 294–296°).

C₁₈H₁₆O₇ (344.3) Ber. C 62.79 H 4.68 Gef. C 62.67 H 4.50

Das mit Acetanhydrid und Pyridin dargestellte 3,7-Diacetoxy-5,3',4'-trimethoxy-flavon hatte den Schmp. 144–145° und stimmte mit dem der Lit. (Schmp.⁷⁾: 146–148° überein.

C₂₂H₂₀O₉ (428.4) Ber. C 61.68 H 4.71 2COCH₃ 20.09 Gef. C 61.43 H 4.61 COCH₃ 19.95

c) Partielle Hydrolyse von Brassicosid zu Isorhamnetin-7-mono- β -D-glucosid (Brassicin) (1b): 100 mg Brassicosid (1a) in 10 ccm Methanol wurden nach Zugabe von 25 ccm 0.1-proz. Salzsäure $\frac{1}{2}$ Sde. auf dem Dampfbad erhitzt. Nach Neutralisation wurde das abfiltrierte Hydrolyseprodukt an einer kleinen Polyamidsäule mit Methanol fraktioniert. Das im UV-Licht gelb fluoreszierende Hauptglykosid kristallisierte aus 80-proz. Äthanol. Der Schmp. des Glucosids 1b betrug 253–255°. Im Gemisch mit dem aus der gleichen Droge auf anderem Wege isolierten⁸⁾ und von uns erst kürzlich synthetisierten¹⁾ Glykosid entstand keine Schmp.-Depression.

UV (in Methanol): λ_{\max} (log ϵ) 255 (4.37), 372 m μ (4.30).

C₂₂H₂₂O₁₂ (478.4) Ber. C 55.23 H 4.64 Gef. C 54.93 H 4.82

⁵⁾ Ultramid K 228 BM 2 d. Fa. Badische Anilin- & Soda-Fabrik AG, Ludwigshafen.

⁶⁾ G. Zemplén, R. Bogнар und L. Farkas, Ber. dtsh. chem. Ges. 76, 267 (1943).

⁷⁾ R. Kuhn und I. Löw, Ber. dtsh. chem. Ges. 77, 208 (1944).

⁸⁾ Dissertat. H. Krämer, Univ. München 1966.

Methylierung des *Glucosids* mit *Diazomethan* und nachfolgende Hydrolyse mit 10-proz. Schwefelsäure lieferte den *3.5.3'.4'-Tetramethyläther 2c des Quercetins* vom Schmp. 283 bis 285° (Lit.⁹⁾: Schmp. 284–285°).

$C_{19}H_{18}O_7$ (358.3) Ber. C 63.68 H 5.06 $4OCH_3$ 34.64 Gef. C 63.90 H 5.10 OCH_3 34.82

3stdg. Hydrolyse mit 10-proz. *Salzsäure* unter Rückfluß ergab einen Agluconanteil von 65.2% (ber. 66.2%).

d) *Identifizierung des Disaccharidanteils als Sophorose*: 10 mg *Brassicosid* (1a) wurden mit 3 ccm 0.1-proz. *Salzsäure* 20 Min. auf dem Dampfbad erhitzt. Nach 1 tägigem Stehenlassen im Eisschrank wurde vom Aglucon abfiltriert, die saure Lösung über eine kleine Perlonsäule gegeben und mit Wasser eluiert, bis die Lösung gelb war. Zur Entfernung der Salzsäure gaben wir über eine mit Amberlite-IR-4 gefüllte Säule (Durchmesser 2 cm, Höhe 30 cm). Die säurefreie Lösung wurde i. Vak. unter Stickstoff zur Trockne eingedampft, der Rückstand in einigen Tropfen Wasser aufgenommen und zur Papierelektrophorese mit Hilfe einer Standardgraph Trichterfeder F-Nr. 52 strichförmig auf die Startlinie eines 30 cm langen und 4 cm breiten Streifens Schleicher & Schüll-Papier (2043 b Mgl.) aufgetragen. Gerät Elphor d. Fa. Bender und Hobein-München; Spannung 110 V. Entwicklungsdauer 13 Stdn. Pufferlösung (Lösung von 15.6 g Borsäure, 14.2 g Borax und 3.67 g Natriumchlorid in 1 l Wasser mit 10% Natronlauge eingestellt auf pH 8.25). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde mit Anilinthalatlösung sichtbar gemacht.

Wanderungsstrecke zur Kathode	MG-Wert *)
Disaccharid aus Brassicosid: 1.5 cm	0.24
Sophorose-Test: 1.6 cm	0.26
Maltose-Test: 1.8 cm	0.30
Cellobiose-Test: 2.0 cm	0.32
Glucose-Test: 6.1 cm	1.00

$$*) \text{ MG-Wert} = \frac{\text{Wegstrecke Disaccharid v. Startpunkt}}{\text{Wegstrecke Glucose v. Startpunkt}}$$

Zusätzlich wurde das Disaccharid aus Brassicosid mit 1-proz. *Natriumborhydrid*-Lösung reduziert und der Zuckeralkohol im Vergleich mit authent. Sophoritol, Cellobiitol und Maltitol nach der Methode von *Bourne, Hutson* und *Weigel*¹⁰⁾ in Molybdätpufferlösung pH 5.0 elektrophoretisch untersucht. Spannung 220 Volt, Entwicklungsdauer 2 Stdn. Es wurde mit ammoniakalischer Silbernitratlösung sichtbar gemacht.

Wanderungsstrecke zur Anode	MS-Werte **)
Zuckeralkohol aus Brassicosid: 7.2 cm	0.82
Sophoritol-Test: 7.4 cm	0.83
Maltitol-Test: 6.2 cm	0.69
Cellobiitol-Test: 3.4 cm	0.39
Glucitol-Test: 8.9 cm	1.00

$$**) \text{ MS-Wert} = \frac{\text{Wegstrecke des red. Zuckers v. Startpunkt}}{\text{Wegstrecke des Glucitols v. Startpunkt}}$$

Isolierung von Brassidin (1c) aus Sinapis arvensis L.: 2 kg getrocknete Blüten wurden mit Methanol im Siccotopf erschöpfend extrahiert. Die Reinigung von Ballaststoffen erfolgte wie bei der Isolierung von Brassicosid beschrieben. Aus der auf 800 ccm eingeeengten Extrakt-

⁹⁾ G. F. Attree und A. G. Perkin, J. chem. Soc. [London] 1927, 234.

¹⁰⁾ E. J. Bourne, D. H. Hutson und H. Weigel, J. chem. Soc. [London] 1960, 4252.

lösung fiel nach 14 Tagen ein gelber Niederschlag aus, der nach dem Trocknen 12 g rohes Mischkristallinat ergab. Die Reinigung von der Hauptmenge der Ballaststoffe wurde wieder an einer Perlonsäule (4 cm Durchmesser, Füllhöhe 50 cm), mit 90-proz. Methanol als Elutionsmittel vorgenommen. Zur Auftrennung des Gemisches wurde an mehreren Kieselgelsäulen (4.5 cm Durchmesser, Füllhöhe 15 cm, Beladung mit je 1 g Mischkristallinat) mit Äthylacetat/Methanol/Wasser (100 : 16.5 : 13.5) chromatographiert. *Brassicidin* (**1c**) erschien als erste breite gelbe Zone. Kristallisation aus reinem Methanol ergab 1.2 g hellgelbe Nadeln vom Schmp. 222–224°.

UV (in Methanol): λ_{\max} (log ϵ) 255 (4.41), 358 $m\mu$ (4.31).

$C_{28}H_{32}O_{16}$ (624.6) Ber. C 53.84 H 5.17 Gef. C 53.92 H 5.33

a) Die quantitative Hydrolyse von **1c** lieferte 49.5% *Isorhamnetin* (ber. 50.6), identifiziert als *Tetraacetat* (Schmp. 206–208°). In der Hydrolyselösung waren chromatographisch *Glucose* und *Rhamnose* nachweisbar. Das Mischosazon wurde durch Behandlung mit Aceton in *Glucosazon* (Schmp. 204–208°) und *Rhamnosazon* (178–179°) getrennt.

b) Methylierung des *Glykosids* **1c** mit *Dimethylsulfat* und nachfolgende Hydrolyse mit 10-proz. *Salzsäure* lieferte wieder den *5.3'.4'-Trimethyläther* **2b** des *Quercetins* vom Schmp. 291–294° (Lit. 7); Schmp. 294–296°.

c) Durch partielle Hydrolyse von **1c** mit 0.1-proz. *Salzsäure* nach der bei *Brassicosid* angegebenen Weise wurden 2 *Glykoside* erhalten, die auf *Polyamid* mit *Methanol* getrennt wurden. Das eine *Glykosid* hatte den Schmp. 175–177° und war im Gemisch mit synthetischem *Isorhamnetin-3-mono- β -D-glucosid* (**1d**)¹⁾ ohne Schmp.-Depression (R_F ¹¹⁾ 0.65). Das zweite *Glykosid* vom Schmp. 248–250°, das als erste Zone auf der Säule wandert, lieferte bei der sauren Hydrolyse nur *Isorhamnetin* und *Rhamnose* und erwies sich als ein *Isorhamnetin-7-rhamnosid* (**1e**) (R_F ¹¹⁾ 0.75).

$C_{22}H_{22}O_{11}$ (462.4) Ber. C 57.14 H 4.80 Gef. C 57.04 H 4.65

Methylierung mit *Diazomethan* und nachfolgende Hydrolyse ergab ein Methylierungsprodukt vom Schmp. 282–284°, das mit dem aus *Isorhamnetin-7-mono- β -D-glucosid* erhaltenen *3.5.3'.4'-Tetramethyl-quercetin* (**2c**) keine Schmp.-Depression ergab. Die quantitative Hydrolyse lieferte einen *Aglukonanteil* von 66.4% (ber. 68.4%).

¹⁾ In Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser (10 : 2 : 3).