

Hildebert Wagner, Ludwig Hörhammer, Gerold Aurnhammer und Lorand Farkas

Strukturaufklärung und Synthese des Didymins, eines Isosakuranetin-7- β -rutosids aus *Monarda didyma* L.

Aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München und der Forschungsgruppe für Alkaloidchemie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest-XI, Gellert tér 4

(Eingegangen am 31. Juli 1967)

Für das von *Brieskorn* und *Meister* aus *Monarda didyma* L. isolierte Isosakuranetin-rhamnoglucosid konnte durch hydrolytischen Abbau, Permethylierung, NMR-Spektroskopie und Dehydrierung zum Acacetin-7-rutosid, die Struktur eines 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavanon-7- β -[6-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosids] (Isosakuranetin-7-rutosids) ermittelt werden. Der endgültige Strukturbeweis gelang durch die Synthese aus Isosakuranetin und Acetobromrutinose nach einer modifizierten Koenigs-Knorr-Synthese. In analoger Weise wurde Isosakuranetin-7-mono- β -D-glucosid (Isosakuranin) dargestellt.

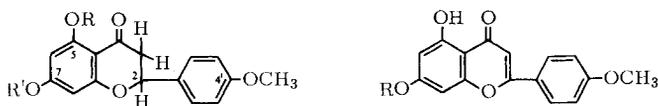
Wie wir in einer Kurzmitteilung¹⁾ berichteten, besitzt der Disaccharidanteil eines neuen Isosakuranetin-7-rhamnoglucosids (Didymin, **2a**) vom Schmp. 209—212°, das von *Brieskorn* und *Meister*²⁾ aus *Monarda didyma* L. isoliert wurde, Rutinose-Struktur. Der Strukturnachweis gelang durch Permethylierung des Glykosids, nachfolgende Hydrolyse und den gaschromatographischen Nachweis der beiden Methylzucker 2,3,4-Tri-*O*-methyl-D-glucose und 2,3,4-Tri-*O*-methyl-L-rhamnose. Auch die in der Kurzmitteilung gegebenen NMR-spektroskopischen Daten für das Heptaacetyl- bzw. Heptatrimethylsilyl-didymin waren mit einer 1→6-Verknüpfung von Rhamnose und Glucose in Einklang. Partielle Hydrolyse von **2a** lieferte Isosakuranetin-7-mono- β -D-glucosid (**2d**), das kürzlich von *Pacheco* und *Grouiller*³⁾ auf dem Wege der Chalcon-Kondensation dargestellt worden war. Demnach mußte die Rutinose an das C-7-Hydroxyl gebunden sein. Daß es sich bei dem neuen Glykosid um das Isosakuranetin-7- β -rutosid (**2a**) handelte, haben wir in der Zwischenzeit auf folgende Weise bewiesen. Das Didymin-heptaacetat läßt sich mit Jod und Essigsäure zu einem Flavonglykosid dehydrieren, das im IR-Spektrum und Schmelzpunkt mit dem natürlich vorkommenden und von *Zemplén* und *Bognar*⁴⁾ synthetisierten 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon-7-rutosid (Linarin) (**3**) identisch ist. Der endgültige

1) H. Wagner, L. Hörhammer, G. Aurnhammer und L. Farkas, Tetrahedron Letters [London] **19**, 1837 (1967).

2) C. H. Brieskorn und G. Meister, Arch. Pharmaz. **298**, 435 (1965).

3) H. Pacheco und A. Grouiller, Bull. Soc. chim. France **1965**, 2937.

4) G. Zemplén und R. Bognar, Ber. dtsh. chem. Ges. **74**, 1818 (1941).



	R	R'
1	H	H
2a	H	β -Rutinosyl
b	H	β -Rutinosyl-hexaacetat
c	CH ₃ CO	β -Rutinosyl-hexaacetat
d	H	β -Glucosyl

3: R = Rutinosyl

Strukturbeweis des Didymins gelang durch Umsetzung von **1** mit α -Acetobromrutinose in Chinolin und in Gegenwart von Silbercarbonat. Nach chromatographischer Reinigung wurde Didymin-hexaacetat (**2b**) und nach Verseifen mit Natrium-methylatlösung das Didymin (**2a**) selbst erhalten. Dieses war ebenso wie sein Heptaacetat (**2c**) mit den natürlichen Verbindungen in jeder Hinsicht identisch. Damit kommt dem Didymin die Struktur **2a** eines 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7- β -[6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosides] zu. — Bisher haben über die Isolierung eines Isosakuranetin-rutinosides aus *Citrus sinensis* unabhängig voneinander Dunlap und Wender⁵⁾ sowie Gentili und Horowitz⁶⁾, allerdings ohne Angabe genauer Daten, berichtet. Eine Identität mit Didymin konnte an Hand eines Misch-Schmp. bisher nur für das Glykosid der zweiten Autoren festgestellt werden. Eine Mischprobe mit Atsinosid (Schmp. 210–212°), das von Sergienko und Mitarbb.⁷⁾ aus *Acinos thymoides* isoliert und als ein Isosakuranetin-7- β -[4-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] angesehen wurde, war mangels Vergleichssubstanz nicht möglich. Didymin ist isomer mit Poncirin⁸⁾, dessen Disaccharidkomponente, die Neohesperidose, eine 2-O- α -L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose darstellt. Im Gegensatz zum bitter schmeckenden Poncirin ist das Didymin geschmacklos.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie danken wir für die Förderung dieser Arbeit durch Sachbeihilfen. Herrn Dr. Horowitz (Pasadena) sind wir für die Übersendung des Isosakuranetin-rutinosids aus *Citrus sinensis* zu Dank verpflichtet. Unser Dank gilt besonders Herrn Professor Dr. O. Volk, Direktor des Pharmakognostischen Instituts der Universität Würzburg, für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

5) W. J. Dunlap und S. H. Wender, Arch. Biochem. Biophysics **87**, 228 (1960); Anal. Biochem. **4**, 110 (1962), **12**, 316 (1965).

6) B. Gentili und R. Horowitz, Bull. nat. Inst. agric. Sci. [Tokyo] **31**, 78 (1965).

7) T. A. Sergienko, L. S. Kazarnovskii und V. J. Litvinenko, Khim. Prirodn. Soedin., Akad. Nauk Uz. SSR **2** (3), 166 (1966), C. A. **65**, 15719 (1966).

8) R. M. Horowitz und B. Gentili, Tetrahedron [London] **19**, 773 (1963).

Beschreibung der Versuche⁹⁾

Isolierung von Didymin (2a): 1.8 kg getrocknetes Blattmaterial von *Monarda didyma* L. wurde abweichend von der Methode *Brieskorn* und *Meister*²⁾ zunächst erschöpfend mit Chloroform und anschließend mit Methanol extrahiert. Der auf 300 ccm eingeeengte Methanol-extrakt wurde mit 100 ccm Aceton versetzt und der dabei anfallende sirupöse Niederschlag verworfen. Man verdünnte den Extrakt auf das Doppelte mit Wasser und zog das Methanol i. Vak. ab. Der bei +5° ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und die wäßr. Lösung in Anteilen mit insgesamt 6 l Äthylacetat ausgeschüttelt. Aus Äthylacetat erhielt man einen sirupösen braunen Extrakt, der auf Polyamidsäulen (50×6 cm) mit Wasser aufgetrennt wurde. Aus den ersten gefärbten Fraktionen erhielt man **2a** in feinen farblosen Nadeln, aus Methanol Schmp. 209–212° (Lit.²⁾: Schmp. 211–213°). Ausb. 0.67 g (0.03%). Das i. Hochvak. bei 120° getrocknete Glykosid enthält nach Karl-Fischer 1 Mol. Kristallwasser (ber. 3.03%, gef. 3.4%).

UV (in Methanol p.a.): λ_{\max} (log ϵ) 287 (4.16), Infl. 332 m μ . (3.45).

$[\alpha]_D^{20}$: -105.3° ($c = 1.44$ in Methanol). Lit.²⁾: $[\alpha]_D^{20}$: 0°.

C₂₈H₃₄O₁₄·H₂O (612.6) Ber. C 54.89 H 5.93 1OCH₃ 5.08
Gef. C 55.02 H 6.04 OCH₃ 5.47

a) *Acetylierung*: 100 mg **2a** wurden bei Raumtemperatur mit *Acetanhydrid* und Pyridin 15 Stdn. acetyliert. Farblose Nadeln des *Didymin-heptaacetates (2c)*, aus Äthanol Schmp. 116–119° (Lit.²⁾: Schmp. 105–106°). Ausb. 0.11 g (75%).

$[\alpha]_D^{20}$: -38.0° ($c = 1.3$ in Chlf.).

C₄₂H₄₈O₂₁ (888.8) Ber. C 56.73 H 5.45 7CH₃CO 33.9
Gef. C 56.80 H 5.39 CH₃CO 34.6

NMR (in CDCl₃, int. TMS): $\delta = 4.6$ –5.4 (8 Zuckerprotonen), $\delta = 3.6$ –4.1 (4 Zuckerprotonen), Rhamnose-H-1: $\delta = 4.72$ ($J = 1.0$ Hz).

b) *Quantitative Hydrolyse* von 59.4 mg **2a** mit 1.5 n HCl über 1½ Stdn. lieferte 25.8 mg *Isosakuranetin (1)* vom Schmp. 190–192° (Lit.¹⁰⁾: Schmp. 193–194°). Ber. 46.6%, gef. 43.5%.

Im Hydrolysat wurden papierchromatographisch *Glucose* (R_F 0.17) und *Rhamnose* (R_F 0.34) nachgewiesen; System: Äthylacetat/Eisessig/Wasser (3:1:3). Die Identifizierung erfolgte über die Osazone (*Glucosazon*, Schmp. 205–207°, *Rhamnosazon*, Schmp. 178–181°).

c) *Partielle Hydrolyse* von 0.10 g **2a** mit 2.5 ccm *Ameisensäure* in 20 ccm Cyclohexanol über 9 Stdn. (Rückfluß) und Reinigung durch präparative Papierchromatographie auf Schleicher & Schüll 2043 b mit 2proz. Essigsäure lieferte 15 mg *Isosakuranetin-7-mono- β -D-glucosid (2d)* vom Schmp. 184–187° (Lit.³⁾: Schmp. 184–186°).

1 stdg. Hydrolyse von **2d** mit 2 n HCl lieferte nur *Isosakuranetin* und *Glucose*.

d) Zur *Permethylierung* wurden in Anlehnung an die Methode von *Wallenfels* und *Mitarbb.*¹¹⁾ 0.109 mg **2a** in 2 ccm Dimethylsulfoxid bei 0° unter Stickstoff mit 21 mg Ba(OH)₂·8H₂O und 500 mg peroxidfreiem BaO (Fa. Degussa) versetzt. Nach Zusatz von 3 ccm *Methyljodid* wurde bei Raumtemperatur unter N₂ 41 Stdn. lang methyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir 0.11 g eines halbfesten, chromatographisch reinen Per-

⁹⁾ Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Die NMR-Spektren wurden mit dem Varian A 60 aufgenommen.

¹⁰⁾ *J. Shinoda* und *S. Sato*, J. pharmac. Soc. Japan [Yakugakuzasshi] **48**, 109 (1928).

¹¹⁾ *K. Wallenfels*, *G. Bechtler*, *R. Kuhn*, *H. Trischmann* und *H. Egge*, Angew. Chem. **75**, 1014 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. **2**, 515 (1963).

methylierungsproduktes. Nach Hydrolyse mit 5proz. Salzsäure und Neutralisation mit Dowex-Ionenaustauscher (1×8) wurde das Gemisch der Methylzucker gaschromatographisch¹²⁾ untersucht. Zum Testvergleich wurden Methylzucker aus permethyliertem Rutin und Naringin dargestellt.

Gaschromatographie: 2 m×4 mm Säule mit 15% Polyphenyläther auf Gaschrom Q, Temperatur 170°, Papiervorschub: 5 Min./inch., Gasdurchfluß: 77 ccm/Min. Retentionszeit für 2.3.4-Tri-*O*-methyl-L-rhamnose = 27.5 Min., für 2.3.4-Tri-*O*-methyl-D-glucose = 43.0 Min. Standard: 2.3.4.6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose, Ret.-Zeit = 31.2 Min.

Dehydrierung von 2c zu 5.7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid], Acacetin-7-rutinosid (3): 0.765 g **2c** wurden in Anlehnung an eine Methode von Mahesh und Seshadri¹³⁾ in 7.5 ccm Eisessig nach Zugabe von 0.765 g Kaliumacetat, 0.39 g Jod und 1.2 ccm Acetanhydrid 24 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde in 100 ccm 0.5proz. eisgekühlte Kaliumjodidlösung eingetropfelt. Nach 1 Stde. wurde filtriert, der Rückstand in 25 ccm Methanol gelöst und die Lösung durch Zugabe einer geringen Menge Natriumhydrogensulfid entfärbt. Durch Verdünnen mit Wasser entstand ein Niederschlag, der getrocknet und anschließend mit 1.8 *n* Natriummethylatlösung behandelt wurde. Aus Methanol/Wasser erhielt man 0.25 g rohes Linarin. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus wäbr. Pyridin fiel das reine Linarin (**3**) in feinen farblosen Kristallen an, die bei 265° erweichen und bei 272–273° schmelzen. Ausb. 0.092 g (18%). Der Misch-Schmp. mit authent. Linarin (Lit.⁴⁾: Schmp. 265–268° lag bei 265–269°.

UV (in Methanol p.a.): λ_{\max} (log ϵ) 269 (4.27), 339 m μ (4.25).

$[\alpha]_D^{25}$: –88.2° (*c* = 1.1 in Pyridin). Lit.⁴⁾: $[\alpha]_D^{25}$: –87.0° (*c* = 0.05 in Pyridin).

C₂₈H₃₂O₁₄ (592.5) Ber. C 56.75 H 5.44 Gef. C 57.03 H 5.48

Synthes. 5.7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-hexaacetat, Isosakuranetin-7-β-rutinosyl-hexaacetat, Didymine-hexaacetat (2b): 0.534 g **1**, hergestellt nach einer von uns modifizierten Methode von Shinoda und Sato¹⁰⁾ aus *p*-Methoxyzimtsäurechlorid und Phloroglucin, wurden in 8 ccm Chinolin mit 0.648 g Silbercarbonat und 0.9 g Drierite 30 Min. geschüttelt. Nach Zugabe von 1.53 g Acetobromrutinose, hergestellt nach Zemplén und Gerecs¹⁴⁾, wurde weitere 3 Stdn. unter Lichtabschluß geschüttelt. Man nahm die Suspension in 10 ccm Chloroform auf und zentrifugierte die Silbersalze ab. Nach Entfernen des Chloroforms i. Vak. wurde die Lösung unter Rühren in 120 ccm 10proz. Essigsäure getropft. Die sich absetzende dunkelbraune Lösung wurde durch azeotrope Destillation mit Benzol wasserfrei gemacht und auf eine Silicagel-Säule (5×40 cm) aufgetragen. Elution mit Toluol/Äthylacetat (8:3) lieferte in den ersten Fraktionen unverändertes Isosakuranetin und in den nachfolgenden Fraktionen das Kupplungsprodukt **2b**. FeCl₃-Reaktion grün. Aus Acetonitril Kristalle vom Schmp. 132–134°. Ausb. 0.748 g (51%).

C₄₀H₄₆O₂₀ (846.8) Ber. C 56.73 H 5.48 Gef. C 56.45 H 5.48

Synthes. Didymine, 5.7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid], Isosakuranetin-7-β-rutinosid (2a): 0.72 g **2b** in 10 ccm Methanol wurden mit 100 ccm 1.8 *n* Natriummethylatlösung versetzt. Nach 20 Min. bei 0° wurde mit Essigsäure neutralisiert. Man schüttelte die wäbr. Lösung mit Äthylacetat aus und erhielt 0.28 g Glykosid **2a** nach dem Umkristallisieren aus Methanol in Nadeln vom Schmp. 210–212°. Aus der Mutterlauge waren durch Silicagel-Säulenchromatographie mit Äthylacetat/Methanol/Wasser

¹²⁾ C. T. Bishop in Advances in Carbohydrate Chemistry, Vol. 19, S. 95, Academic Press, New York—London, 1964.

¹³⁾ V. B. Mahesh und T. S. Seshadri, J. sci. ind. Res. **148**, 608 (1955).

⁴⁾ G. Zemplén und A. Gerecs, Ber. dtsh. chem. Ges. **70**, 1099 (1937).

(40 : 7 : 5) noch weitere 0.125 g Didymin erhältlich. (Gesamt-Ausb. 78 %). Im Gemisch mit isoliertem Didymin entstand keine Schmp.-Depression.

UV (in Methanol): λ_{\max} (log ϵ) 287 (4.14), Infl. 332 m μ (3.42).

$[\alpha]_D^{20}$: -100.9° ($c = 1.4$ in Methanol).

$C_{28}H_{34}O_{14} \cdot H_2O$ (612.6) Ber. C 54.89 H 5.93 1 OCH₃ 5.08

Gef. C 54.85 H 5.89 OCH₃ 5.41

Das aus dem Glykosid in üblicher Weise hergestellte *Vollacetat* (**2c**) ergab mit dem Heptacetat aus natürlichem Didymin keine Depression (Misch-Schmp. 116–118°).

5.7-Dihydroxy-4'-methoxy-7-mono- β -D-glucosid, *Isosakuranetin-7-mono- β -D-glucosid* (**2d**): 0.12 g **1** in 1 ccm Chinolin wurden mit 0.14 g Silbercarbonat und 0.16 g Drierite 30 Min. geschüttelt. Nach Zugabe von 0.18 g α -Acetobromglucose wurde weitere 2 Stdn. unter Lichtabschluß geschüttelt. Man verdünnte mit 10 ccm Chloroform, zentrifugierte von den Silber-salzen ab, engte die Lösung i. Vak. ein und tropfte sie in 25 ccm 10proz. Essigsäure ein. Man entacetylierte durch 20 min. Stehenlassen mit 20 ccm 1.8 m Natriummethylatlösung bei 0°, neutralisierte mit Essigsäure und verdünnte mit 40 ccm Wasser. Zur Entfernung des Chinolins wurde 3 mal mit je 50 ccm Petroläther ausgeschüttelt. Nicht umgesetztes Aglukon wurde durch 6 malige Extraktion mit Chloroform/Petroläther (6 : 4) und 2 malige Nachextraktion mit 30 ccm Chloroform entfernt. Anschließend wurde 10 mal mit je 50 ccm Äthylacetat ausgeschüttelt. Aus den vereinigten Lösungen erhielten wir nach Umkristallisieren aus Aceton 0.092 g (49%) **2d**, Schmp. 183–186°. Mit dem durch partielle Hydrolyse aus natürlichem Didymin erhaltenen Glucosid blieb der Misch-Schmp. ohne Depression.

Das bei 120° i. Hochvak. getrocknete Glykosid enthält nach Karl-Fischer 1 Mol. Kristallwasser (ber. 4.0%, gef. 4.24%).

$C_{22}H_{24}O_{10} \cdot H_2O$ (466.4) Ber. C 56.65 H 5.62 1 OCH₃ 6.64

Gef. C 56.27 H 5.70 OCH₃ 7.01

[343/67]