

Hildebert Wagner, Gerold Aurnhammer, Ludwig Hörhammer und Lorand Farkas

Untersuchungen über die Glykoside des Acacetins, III¹⁾

Endgültige Konstitutionsaufklärung und Synthese der Flavonglykoside Fortunellin, Rhoifolin und Isorhoifolin²⁾

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

(Eingegangen am 17. Dezember 1968)

Die Acetate der Flavanon-7-rhamnoglucoside Poncirin (8), Naringin (9) und Narirutin (10) wurden durch Dehydrierung mit Jod und Kaliumacetat in die Acacetin- bzw. Apigeninglykosidacetate übergeführt. Verseifung führte zu Acacetin-7-neohesperidosid (Fortunellin, 1), Apigenin-7-neohesperidosid (Rhoifolin, 3) und Apigenin-7-rutinosid (Isorhoifolin, 4). Damit ist die Struktur für diese erstmals aus *Fortunella japonica* Swingle (1), *Rhus succedanea* L. (3) und *Mentha piperita* L. (4) isolierten Flavonglykoside bewiesen.

Im Jahre 1958 isolierte Matsuno³⁾ aus *Fortunella japonica* Swingle ein Acacetin-7-rhamnoglucosid (1), das sich im Zuckeranteil von dem Acacetin-7- β -rutinosid Linarin⁴⁾ unterschied und Fortunellin genannt wurde.

Da der Autor bei der Dehydrierung eines aus *Poncirus trifoliata* Raf. isolierten „Poncirins“ ein Glykosid erhielt, das im Schmelzpunkt mit Fortunellin übereinstimmte, nahm er an, daß der Disaccharidanteil seines Fortunellins mit dem des Isosakuranetin-7-rhamnoglucosids Poncirin identisch sei. Im Jahre 1966 stellte aber Shimokoriyama⁵⁾ fest, daß das von Hattori und Mitarbb.⁶⁾ im Jahre 1944 erstmals isolierte „Poncirin“ ein Gemisch aus zwei verschiedenen Isosakuranetin-rhamnoglucosiden gewesen war.

Um daher den endgültigen Beweis für die vermutete Neohesperidose-Struktur zu liefern, stellten wir das Fortunellin durch vollständige Synthese dar.

Wir gingen von synthetischem 5.7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat (Poncirin-heptaacetat, 11)⁷⁾ aus

¹⁾ II. Mittel.: H. Wagner, G. Aurnhammer, L. Hörhammer und L. Farkas, Chem. Ber. 102, 1445 (1969).

²⁾ Vorläufige Mittel.: H. Wagner, G. Aurnhammer, L. Hörhammer, L. Farkas und M. Nógrádi, Tetrahedron Letters [London] 1968, 1635.

³⁾ T. Matsuno, J. pharmac. Soc. Japan 78, 1311 (1958).

⁴⁾ G. Zemplén und R. Bogner, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 1818 (1941).

⁵⁾ M. Shimokoriyama, Bot. Mag. Tokyo 79, 602 (1966).

⁶⁾ S. Hattori, M. Hasegawa und M. Shimokoriyama, Acta phytochim. [Tokyo] 14, 1 (1944).

⁷⁾ H. Wagner, G. Aurnhammer, L. Hörhammer, L. Farkas und M. Nógrádi, Chem. Ber. 102, 785 (1969).

und dehydrierten dieses nach einer modifizierten Methode von Mahesh und Seshadri⁸⁾ zu **7**. Nachfolgende Verseifung mit Natriummethylatlösung lieferte aus verdünntem Methanol in 60proz. Ausbeute kristallines Acacetin-7- β -neohesperidosid. Ein Misch-Schmelzpunkt konnte nicht durchgeführt werden, da das zur Verfügung stehende natürliche Fortunellin⁹⁾ amorph war und einen zu tiefen Schmelzpunkt aufwies. Ein IR-Vergleich, das chromatographische Verhalten und die NMR-Spektren bewiesen aber zweifelsfrei, daß dem Fortunellin die Struktur 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (**1**) zukommt.

Neben den strukturisomeren Rhamnoglycosiden des Acacetins (4'-Methoxyapigenin), Linarin und Fortunellin, wurde im Pflanzenreich ein ähnliches Isomerenpaar des Apigenins aufgefunden:

Im Jahre 1952 wurde das erste Apigenin-7-rhamnoglycosid, Rhoifolin, aus *Rhus succedanea* L. isoliert. Auf Grund des Misch-Schmelzpunktes, den Hattori und Matsuda¹⁰⁾ mit dem aus Naringin (**9**) synthetisch dargestellten Apigenin-7-rhamnoglycosid¹¹⁾ durchführten, nahm man an, daß Rhoifolin mit dem Dehydrierungsprodukt identisch sei. Da später von Horowitz und Gentili¹²⁾ und auch von Nakabayashi¹³⁾ bewiesen werden konnte, daß **9** ein Derivat der Neohesperidose ist, schien eine Identität von **3** mit Apigenin-7-neohesperidosid wahrscheinlich. In den letzten Jahren wurde Rhoifolin aus verschiedenen anderen Pflanzen isoliert¹⁴⁻¹⁸⁾.

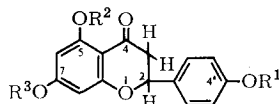
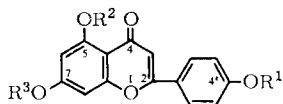
Da aber die Literaturangaben über Schmelzpunkt und optische Drehung dieses isolierten Glykosids teilweise stark variieren, hat es sich möglicherweise bei einigen um ein isomeres Glykosid gehandelt. Während für Rhoifolin in der neueren Literatur mehrfach noch die Struktur eines Apigenin-7-rutinosides angegeben wurde^{14, 19, 20)}, beanspruchten kürzlich russische Autoren diese Struktur für ein neues, aus den Blättern von *Mentha piperita* L. isoliertes Glykosid (Isorhoifolin)²¹⁾. In Spuren kommt dieses Glykosid auch in *Citrus paradisi* vor²²⁾.

Zum endgültigen Strukturbeweis von Rhoifolin und Isorhoifolin synthetisierten wir die beiden Glykoside in folgender Weise. Das bekannte, erstmals im Jahre 1966

- 8) V. B. Mahesh und T. S. Seshadri, J. sci. ind. Res. [New Delhi] **148**, 608 (1955).
- 9) Wir danken Herrn Prof. T. Matsuno für die freundliche Überlassung von natürlichem Fortunellin.
- 10) S. Hattori und H. Matsuda, Arch. Biochem. Biophysics **37**, 85 (1952).
- 11) N. Lorette, T. Gage und S. Wender, J. org. Chemistry **16**, 930 (1951).
- 12) R. Horowitz und B. Gentili, Tetrahedron [London] **19**, 773 (1963).
- 13) T. Nakabayashi, J. agric. chem. Soc. Japan **35**, 942 (1961).
- 14) W. Karrer, Konstitution und Vorkommen der Organ. Pflanzenstoffe, Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart 1958.
- 15) T. Nakaoki, N. Morita und Y. Yoshida, J. pharmac. Soc. Japan **77**, 112 (1957).
- 16) V. Plouvier, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci., Ser. D, **263**, 1529 (1966); ebenda, Ser. D, **265**, 1647 (1967).
- 17) I. Coussio, An. Asoc. quim. argent. **53**, 257 (1965).
- 18) M. Uasue, M. Itaya, M. Inagaki, H. Katayama und N. Kawamura, J. pharmac. Soc. Japan **87**, 47 (1967).
- 19) R. Bailey, Oligosaccharides, Pergamon Press, Oxford 1965.
- 20) J. B. Harborne, Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, London und New York 1967.
- 21) E. V. Gella, G. V. Makarova, Y. G. Borisynk und V. J. Litvinenko, Farmatsevt. Zh. (Kiev) **21**, 58 (1966); C. A. **65**, 13 810 e (1966).
- 22) H. E. Nordby, J. F. Fisher und T. J. Kew, Phytochemistry **7**, 1653 (1968).

synthetisch dargestellte Naringin²³⁾ wurde zum 5.7.4'-Trihydroxy-flavanon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-octaacetat (**12**) acetyliert. Durch Dehydrierung mit Jod und Kaliumacetat wurde in beschriebener Weise das Apigenin-7- β -neohesperidosyl-octaacetat (**5**) und nach Entacetylierung aus verdünntem Pyridin das kristalline Apigenin-7-neohesperidosid vom Schmp. 200–205° erhalten. Das synthetische Glykosid gibt mit dem von *Plouvier*¹⁶⁾ aus *Lupinus* L. und von *Cousio*¹⁷⁾ aus *Chorisia*-Arten isolierten Rhoifolin im Misch-Schmelzpunkt keine Depression. Auch das von *Hattori*¹⁰⁾ aus *Rhus succedanea* L. gewonnene Glykosid ist außer der abweichenden optischen Drehung in allen anderen physikalischen Daten mit dem Syntheseprodukt in Übereinstimmung. Damit ist bewiesen, daß dem Rhoifolin die Struktur eines Apigenin-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosides] (**3**) zukommt.

Zum Apigenin-7-rutinosid (**4**) gelangten wir ausgehend von 5.7.4'-Trihydroxy-flavanon-7- β -[6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-octaacetat (**13**)²⁴⁾ auf ähnlichem Wege. Wir erhielten aus verdünntem Methanol kristallines Apigenin-7-rutinosid (**4**) vom Schmp. 268–270° in 55 proz. Ausbeute. Sein Octaacetat (**6**) schmolz bei 178–180°. Schmelzpunkt und optische Drehung von natürlichem Isorhoifolin (Schmp. 269–270°, $[\alpha]$: –92.0°, in DMF) stimmen mit den Werten des synthetischen Glykosides überein. Mit dem strukturisomeren synthetischen **3** gibt das Rutinosid im Misch-Schmelzpunkt eine Depression von 75–89°. Damit ist auch die Struktur des Isorhoifolins als 5.7.4'-Trihydroxy-flavon-7- β -[6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] bewiesen.



	R ¹	R ²	R ³
1	CH ₃	H	β -Neohesperidosyl
2	CH ₃	H	β -Rutinosyl
3	H	H	β -Neohesperidosyl
4	H	H	β -Rutinosyl
5	CH ₃ CO	CH ₃ CO	β -Neohesperidosyl-hexaacetat
6	CH ₃ CO	CH ₃ CO	β -Rutinosyl-hexaacetat
7	CH ₃	CH ₃ CO	β -Neohesperidosyl-hexaacetat

	R ¹	R ²	R ³
8	CH ₃	H	β -Neohesperidosyl
9	H	H	β -Neohesperidosyl
10	H	H	β -Rutinosyl
11	CH ₃	CH ₃ CO	β -Neohesperidosyl-hexaacetat
12	CH ₃ CO	CH ₃ CO	β -Neohesperidosyl-hexaacetat
13	CH ₃ CO	CH ₃ CO	β -Rutinosyl-hexaacetat

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie danken wir für die großzügige Förderung dieser Arbeit durch Sachbeihilfen.

²³⁾ S. Kamiya, S. Esaki und M. Hama, Agric. biol. Chem. [Tokyo] **31**, 402 (1967).

²⁴⁾ H. Wagner, G. Aurnhammer, L. Hörhammer und L. Farkas, Chem. Ber. **102**, 2089 (1969), nachstehend.

Beschreibung der Versuche²⁵⁾

Synth. Fortunellin, 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid], Acacetin-7-β-neohesperidosid (1): 0.50 g *5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat (11)* in 4 ccm Eisessig wurden mit 1 ccm Acetanhydrid, 0.50 g *Kaliumacetat* und 0.26 g *Jod* versetzt. Nach 21 stdg. Erhitzen unter Rückfluß tropfte man die erkaltete Lösung in 100 ccm 0.5proz. eisgekühlte Kaliumjodid-Lösung. Nach 2 Stdn. wurde filtriert, der Rückstand in 50 ccm Methanol gelöst und die Lösung mit Natriumhydrogensulfid entfärbt. Durch Verdünnen mit Wasser entstand ein Niederschlag, der abgesaugt und getrocknet wurde. Nach 25 min. Entacetylieren mit 70 ccm 0.4proz. *Natriummethylat*-Lösung bei 0° erhielt man aus wäßrigem Methanol gelbliche Nadeln von *Acacetin-7-β-neohesperidosid (1)*; nach Klären mit Kohle und Umkristallisieren 0.208 g (60.1%) chromatographisch reines **1** vom Schmp. 213–215°. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus verd. Methanol erhöhte sich der Schmp. auf 219–220°. Aus wäßrigem Pyridin erhielt man hellgelbe Nadeln vom Schmp. 237–240°, die nach Umkristallisieren aus verd. Methanol wieder bei 219–220° schmolzen (Lit.³⁾: 215°). Die IR-Spektren des synthet. und des natürlichen Produktes stimmen überein.

$[\alpha]_D^{24}$: -102.8° ($c = 0.87$, in Pyridin).

$C_{28}H_{32}O_{14} \cdot H_2O$ (610.6) Ber. C 55.13 H 5.66 1 OCH₃ 5.08
Gef. C 55.18 H 5.49 OCH₃ 5.43

UV (Methanol p. a.): λ_{max} (log ϵ) 269 (4.29), 329 m μ . (4.34).

5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat, Fortunellin-heptaacetat (7): 0.11 g **1** wurden mit 1 ccm Pyridin und 1 ccm *Acetanhydrid* sowie 1 Tropfen Dimethylformamid 15 Stdn. bei Raumtemperatur acetyliert. Wie erhielten nach üblicher Aufarbeitung 0.16 g (97.3%) **7** vom Schmp. 131–133°.

$[\alpha]_D^{20}$: -49.0° ($c = 0.84$, in Chloroform).

$C_{42}H_{46}O_{21}$ (886.8) Ber. C 56.83 H 5.23 7 CH₃CO 33.9
Gef. C 57.05 H 5.40 CH₃CO 33.75

NMR (CDCl₃, int. TMS): Acetyl: $\delta = 1.98-2.22$ ppm (18 H); 2.45 (3 H, C-5-Acetoxy). Aglykon: H-3: 6.6; H-6: 6.75 (d, $J = 2.5$ Hz); H-8, H-3', H-5': 6.9–7.2; H-2', H-6': 7.9 (d, $J = 9$ Hz). Rhamnoglucoosyl: Rhamnose-CH₃: 1.25 (d, $J = 6$ Hz); Glucose-H-2,5,6,6, Rhamnose-H-5 und 4'-Methoxyl: 3.85–4.4 (5 + 3 H); Glucose-H-1,3,4 und Rhamnose-H-1,2,3,4: 5.0–5.6 (7 H).

Synthet. Rhoifolin, 5,7,4'-Trihydroxy-flavon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid], Apigenin-7-β-neohesperidosid (3): 0.60 g *5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-octaacetat (12)* in 6 ccm Eisessig wurden mit 0.6 g *Kaliumacetat*, 1.5 ccm Acetanhydrid und 0.3 g *Jod* 15 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach oben beschriebener Reinigung und 15 min. Entacetylierung mit 15 ccm 1.8n *Natriummethylat*-Lösung erhielt man aus wäßrigem Methanol gelbliche Nadeln von rohem *Apigenin-7-β-neohesperidosid (3)*; nach Reinigen mit Kohle und Umkristallisieren aus wäßrigem Pyridin reines, fast farbloses **3** vom Schmp. 200–205°. Der Schmelzpunkt erhöhte sich durch mehrmaliges Umkristallisieren aus wäßrigem Pyridin und zuletzt aus Methanol auf 202–205° (Lit.¹⁰): 200–205°. Ausb. 0.18 g (47.6%).

²⁵⁾ Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Die NMR-Spektren wurden mit dem Varian A 60 aufgenommen.

Das bei 150° i. Hochvak. getrocknete Glykosid enthält nach *Karl Fischer* $\frac{1}{2}$ Mol. H₂O (ber. 1.5%, gef. 1.2%).

$[\alpha]_D^{25}$: -118.7° ($c = 1.07$, in Methanol).

C₂₇H₃₀O₁₄ · $\frac{1}{2}$ H₂O (587.5) Ber. C 55.19 H 5.32 Gef. C 55.12 H 5.25

UV (Methanol p. a.): λ_{\max} (log ϵ) 268 (4.23), 336 m μ (4.30).

5.7.4'-Trihydroxy-flavon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-octaacetat, *Rhoifolin-octaacetat* (**5**): 0.60 g *Rhoifolin* wurden wie üblich acetyliert. Aus Äthanol kristallisierten farblose, kräftige Nadeln von **5**, Schmp. 220–224° (Lit.²⁶): 215–217°. Ausb. 0.871 g (92%).

$[\alpha]_D^{27}$: -47.2° ($c = 1.43$, in Chloroform).

C₄₃H₄₆O₂₂ (914.9) Ber. C 56.45 H 5.05 8 CH₃CO 37.64
Gef. C 56.50 H 5.04 CH₃CO 37.77

NMR (CDCl₃, int. TMS): Acetyl: $\delta = 1.9$ –2.2 ppm (18 H); 2.35–2.50 (6 H, C-5-, C-4'-Acetoxy). Aglykon: H-3: 6.62; H-2', H-6': 7.82 (d, $J = 9$ Hz); H-6: 6.72 (d, $J = 2.5$ Hz); H-8: 7.05 (d, $J = 2.5$ Hz); H-3', H-5': 7.30 (d, $J = 9$ Hz). Rhamnoglycosyl: Rhamnose-CH₃: 1.22 (d, $J = 6$ Hz); Glucose-H-2,5,6,6 und Rhamnose-H-5: 3.9–4.3 (5 H); Glucose-H-1,3,4 und Rhamnose-H-1,2,3,4: 5.05–5.45 (7 H).

Synthet. *Isorhoifolin*, 5.7.4'-Trihydroxy-flavon-7- β -[6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid], *Apigenin-7- β -rutinosid* (**4**): 0.55 g 5.7.4'-Trihydroxy-flavon-7- β -[6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-octaacetat, (*Narirutin-octaacetat*) (**13**) wurden mit 0.5 g *Kaliumacetat* und 0.25 g *Jod* in 5 ccm Eisessig und 1 ccm Acetanhydrid 25 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde in 200 ccm 0.5proz. eisgekühlte KJ-Lösung eingetropft. Nach 2 Stdn. wurde filtriert, der Rückstand wie oben beschrieben gereinigt, getrocknet und mit 0.4proz. *Natriummethylat*-Lösung behandelt. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus verd. Äthanol erhielt man reines gelblich-weißes *Apigenin-7- β -rutinosid* (**4**) in mikroskopisch kleinen Nadeln, Schmp. 262–264°. Ausb. 0.20 g (56.6%). Schmp. nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol 268–270° (Lit.²¹): 269–270°.

Das i. Vak. bei 150° und 15 Torr getrocknete Glykosid verliert 1 Mol. Kristallwasser.

$[\alpha]_D^{23}$: -98.2° ($c = 1.19$, in Pyridin). $[\alpha]_D^{23}$: -91.2° ($c = 0.27$, in DMF); Lit.²¹): $[\alpha]_D^{24}$: -92.0°.

C₂₇H₃₀O₁₄ (578.5) Ber. C 56.04 H 5.23 Gef. C 55.84 H 5.16

UV (Methanol p. a.): λ_{\max} (log ϵ) 268 (4.59), 338 m μ (4.66).

Chromatographie: Polyamidplatte, Nitromethan/Methanol (65 : 35). *Isorhoifolin* R_F 0.24; *Rhoifolin* R_F 0.21.

5.7.4'-Trihydroxy-flavon-7- β -[6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-octaacetat, *Apigenin-7- β -rutinosid-octaacetat* (**6**): 60 mg **4** wurden mit 0.6 ccm Pyridin, 0.6 ccm *Acetanhydrid* und 1 Tropfen Dimethylformamid 15 Stdn. bei Raumtemperatur acetyliert. Wir erhielten nach üblicher Aufarbeitung aus absol. Äthanol **6** in farblosen Nadeln vom Schmp. 178–180°. Ausb. 88 mg (92.9%).

$[\alpha]_D^{25}$: -46.7° ($c = 0.85$, in Chloroform).

C₄₃H₄₆O₂₂ (914.9) Ber. C 56.45 H 5.05 8 CH₃CO 37.6
Gef. C 56.30 H 4.93 CH₃CO 36.5

²⁶ H. Rösler, T. Mabry, F. Cranmer und I. Kagan, *J. org. Chemistry* **30**, 4346 (1965).

NMR (CDCl₃, int. TMS): Acetyl: $\delta = 1.9-2.2$ ppm (18 H); 2.3–2.5 (6 H, C-5-, C-4'-Acetoxy). Aglykon: H-3: 6.6; H-6: 6.7 (d, $J = 2.5$ Hz); H-8: 7.0 (d, $J = 2.5$ Hz); H-3', H-5': 7.3 (d, $J = 9$ Hz); H-2', H-6': 7.92 (d, $J = 9$ Hz). Rhamnoglucosyl: Rhamnose-CH₃: 1.25 (d, $J = 6$ Hz); Glucose-H-5,6,6 und Rhamnose-H-5: 3.8 (4 H); Glucose-H-1,2,3,4 und Rhamnose-H-2,3,4: 5.2–5.4 (7 H); Rhamnose-H-1: 4.75 (d, $J = 1$ Hz).

Chromatographie: Kieselgelplatte, Äther/Toluol (2:1). Isorhoifolin-octaacetat R_F 0.22; Rhoifolin-octaacetat R_F 0.17. Schwarzfärbung mit H₂SO₄ bei 150°.

[570/68]