

Hiroyuki Inouye, Yasuhiko Aoki, Hildebert Wagner, Ludwig Hörhammer, Gerold Aurnhammer und Wolfgang Budweg

Die Flavonglykoside von *Veronicastrum sibiricum* Pennell var. *japonicum* Hara und Synthese des Luteolin-7-neohesperidosids (Veronicaströsid)

Aus dem Pharmazeutisch-Chemischen Institut der Universität Kyoto und dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

(Eingegangen am 2. April 1969)



Aus dem Kraut von *Veronicastrum sibiricum* Pennell var. *japonicum* Hara wurde neben Luteolin-7- β -D-glucopyranosid (**1**) das bisher noch nicht bekannte Luteolin-7- β -neohesperidosid (**2**) (Veronicaströsid) isoliert und identifiziert. Zum Strukturbeweis wurde **2** durch Kondensation von Phloracetophenon-4- β -neohesperidosid mit Protocatechualdehyd über **9** synthetisiert.



Im Rahmen einer Untersuchung über die Inhaltsstoffe von *Veronicastrum sibiricum* Pennell var. *japonicum* Hara, japanischer Name „Kugaiso“, *Scrophulariaceae*, wurden aus der Pflanze von einer der beiden Arbeitsgruppen¹⁾ Mannitol, Aucubin und Arbutin isoliert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Flavonglykosiden, die aus den methanolischen Blatt- und Stengel-Extrakten der gleichen Pflanze durch Chromatographie an Kohlepulver und Polyamid gewonnen werden konnten. Das Glykosid **1** vom Schmp. 247 – 250°, das bei der Hydrolyse 5.7.3'.4'-Tetrahydroxy-flavon (Luteolin) (**3**) und Glucose lieferte, erwies sich als mit dem bekannten Luteolin-7- β -D-glucopyranosid identisch. Das Glykosid **2** kristallisierte aus Methanol und schmolz bei 249 – 251°. Saure Hydrolyse von **2** lieferte gleichfalls Luteolin und als Zucker neben D-Glucose noch L-Rhamnose. Da die Methylierung und nachfolgende Hydrolyse von **2** nur den 5.3'.4'-Trimethyläther **4** des Luteolins ergab, mußten beide Zucker als Biase an die 7-Hydroxygruppe des Luteolins geknüpft sein. Zur Klärung der Verknüpfungswise von Rhamnose mit Glucose wurde Glykosid **2** partiell mit Diazomethan zu **5** methyliert und dann der Enzymhydrolyse mit Rhamnosidase aus *Aspergillus niger*²⁾ unterworfen. Es entstanden L-Rhamnose und der 5.3'.4'-Trimethyläther des Luteolin-7- β -D-glucopyranosids (**6**). Die Analyse des Hexaacetats von **5** (**7**) ergab durch NMR-Vergleiche mit bekannten Rhamnoglucosidacetaten^{3,4)}, daß dem Glykosid **2** die Struk-

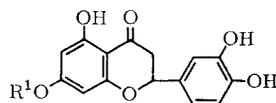
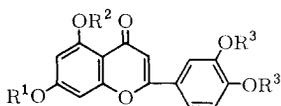
¹⁾ H. Inouye und Y. Aoki, *Phytochemistry* **7**, 1709 (1968).

²⁾ S. Kamiya, S. Esaki und M. Hama, *Memoirs of Shizuoka Women's College* **1962**, 9, vgl. dazu *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **31**, 133 (1967).

³⁾ T. J. Mabry, J. Kagan und H. Rösler, *Phytochemistry* **4**, 177 (1965).

⁴⁾ H. Rösler, T. J. Mabry, M. F. Cranmer und J. Kagan, *J. org. Chemistry* **30**, 4346 (1965).

tur eines bisher noch nicht beschriebenen Luteolin-7- β -neohesperidosids zukommen muß. Wir geben ihm den Namen Veronicastrosid. Das Glykosid unterscheidet sich in Schmelzpunkt und anderen Daten von Luteolin-7-rhamnoglucosiden, die *Nakaoki* und Mitarbb.^{5a)} aus *Lonicera japonica* Thunb. (Lonicerin), *Dranik* und Mitarbb.^{5b)} aus *Cynara scolymus* L. (Scolymosid) und *Olechnowicz-Stepien* und *Krug*⁶⁾ aus *Capsella bursa-pastoris* (L.) Moench isolierten. Die beiden letzteren werden als Rutinoside beschrieben.



	R ¹	R ²	R ³
1	β -D-Glucopyranosyl	H	H
2	β -Neohesperidosyl	H	H
3	H	H	H
4	H	CH ₃	CH ₃
5	β -Neohesperidosyl	CH ₃	CH ₃
6	β -D-Glucopyranosyl	CH ₃	CH ₃
7	β -Neohesperidosyl-hexaacetat	CH ₃	CH ₃
8	β -Neohesperidosyl-hexaacetat	COCH ₃	COCH ₃

9: R¹ = β -Neohesperidosyl

Zum Strukturbeweis synthetisierten wir das Glykosid ausgehend von Phloracetophenon-4- β -neohesperidosid⁷⁾. Kondensation mit Protocatechualdehyd lieferte in 32proz. Ausbeute das bereits von *Chopin* und *Dellamonica*⁸⁾ dargestellte 5.7.3'.4'-Tetrahydroxy-flavanon(Eriodictyol)-7- β -neohesperidosid (**9**). Chromatographische Untersuchungen zeigten kürzlich⁹⁾, daß dieses bisher in der Natur unbekanntes Isomere der Eriocitrins (Eriodictyol-7- β -rutinosid) offenbar in den Früchten von *Fortunella crassifolia* Swing. „Meiwa“ enthalten ist. Wir dehydrierten mit Jod und Acetanhydrid in Gegenwart von Kaliumacetat¹⁰⁾ und erhielten nach Verseifen mit Natriummethylatlösung in 20proz. Ausbeute ein Flavonglykosid, das im Schmp., IR- und NMR-Spektrum mit dem isolierten Luteolin-7-rhamnoglucosid vollkommen übereinstimmte. Damit ist für das Veronicastrosid die Struktur 5.7.3'.4'-Tetrahydroxy-flavon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] bewiesen.

5) 5a) *T. Nakaoki, N. Morita* und *A. Isetani*, J. pharmac. Soc. Japan [Yakugaku Zasshi] **81**, 558 (1961). — 5b) *L. Dranik, V. Chernobai* und *D. Kolesnikov*, Med. Prom. SSSR **18**, 23 (1964), C. A. **61**, 11010b (1964).

6) *W. Olechnowicz-Stepien* und *H. Krug*, Dissertat. pharmac. [Warszawa] **17**, 389 (1965).

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

8) *J. Chopin* und *G. Dellamonica*, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **262**, 1012 (1966).

9) *R. F. Albach* und *G. H. Redman*, Phytochemistry **8**, 127 (1969).

10) *H. Wagner, L. Hörhammer, G. Aurnhammer* und *L. Farkas*, Chem. Ber. **101**, 445 (1968).

Die Autoren danken Herrn Prof. S. Kamiya (Shizuoka Women's Junior College) für die Überlassung des *Aspergillus niger*-Stammes, Herrn Prof. N. Morita (Pharmaz. Fakultät d. Universität Toyama) für eine Probe Lonicerin, Herrn Dr. K. Hozumi (Mikroanalyt. Zentrum der Kyoto Universität) sowie Herrn O. Seligmann (Mikroanalyt. Laboratorium d. Inst. für Pharm. Arzneimittellehre, München) für die Ausführung der Mikroanalysen und Herrn Dr. T. Shingu, Fräulein M. Okawa (Pharmazeut. Fakultät Kyoto) und Herrn O. Seligmann für die Aufnahme der NMR-Spektren.

H. Inouye dankt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (Bad Godesberg) für die Gewährung eines dreimonatigen Stipendiums, das ihm einen Gastaufenthalt am Institut für Pharm. Arzneimittellehre der Universität München ermöglichte.

Beschreibung der Versuche¹⁾

Isolierung der Glykoside 1 und 2

34 kg Blätter und Stengel von *Veronicastrum sibiricum* Pennell var. *japonicum* Hara wurden mit heißem Methanol extrahiert. Nach Zugabe von Wasser zur methanol. Lösung wurde bis zur Methanolfreiheit i. Vak. konzentriert, dann mit Butanol extrahiert, die Wasserphase i. Vak. konzentriert und an einer Kohle/Celite-Säule mit Wasser als Eluiermittel (250 g Kohlepulver, Shirasagi, und 250 g Celite) chromatographiert. Die gesammelten Eluate wurden an einer 2. Kohlesäule chromatographiert. Aus dem Wassereluat fielen ca. 400 g Mannitol aus. Das anschließend mit 15–20proz. Äthanol gewonnene Eluat lieferte 4.2 g Aucubin. Die n-Butanol-Phase verdampften wir i. Vak. und lösten den Rückstand in Wasser. Nach Ausschütteln mit Äther wurde die wäbr. Phase an einer Perlonsäule zunächst mit Wasser und später mit Methanol/Wasser-Gemischen chromatographiert. Nach je 100 ccm Eluiermittel wurde der Methanolanteil um 10% erhöht. Aus den Eluaten mit 40–60proz. Methanol wurden 900 mg einer Mischung der beiden Glykoside 1 und 2 erhalten. Aus den Eluaten mit 60–80proz. Methanol konnten noch 1.5 g des Rohglykosides 1 gewonnen werden.

Isoliertes 5.7.3'.4'-Tetrahydroxy-flavon-7- β -D-glucopyranosid (Luteolin-7- β -D-glucopyranosid) (1): Durch Umkristallisieren des Rohglykosides aus Methanol feine gelbe Nadeln vom Schmp. 247–250°. Das in üblicher Weise mit Acetanhydrid und Pyridin hergestellte Heptaacetat schmolz aus Äther/Petroläther bei 235–238° (Lit.¹²⁾: 232°). Hydrolyse von 1 mit 5proz. Salzsäure ergab Luteolin und D-Glucose. Im Misch-Schmp. mit authent. Luteolin-7- β -D-glucopyranosid (Lit.¹³⁾: Schmp. 258°) entstand keine Depression. Auch die IR- und NMR-Spektren von isoliertem und authent. Glykosid stimmten überein.

Isoliertes 5.7.3'.4'-Tetrahydroxy-flavon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Luteolin-7- β -neohesperidosid) (2): Aus dem Glykosidgemisch (1+2) der Perlonsäule wurde Glykosid 2 durch erneute Chromatographie an Feinperlon (20–50 μ Korngröße) abgetrennt. Aus 250 mg Glykosidgemisch wurden an 100 g Pulver mit 50proz. Methanol als Eluiermittel 45 mg 2 erhalten. Aus Methanol plättchenförmige Kristalle vom Schmp. 249–251°.

UV (Methanol p. a.): λ_{\max} 254 m μ (log ϵ 4.26), 349 (4.29); Infr. 265 (4.23).

$C_{27}H_{30}O_{15} \cdot H_2O$ (612.6) Ber. C 52.94 H 5.27 Gef. C 52.60 H 5.25

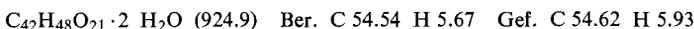
- 1) Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian-A-60 gemessen (TMS innerer Standard). Die mit einem Büchi-Schmelzpunktapparat bestimmten Schmelzpunkte sind unkorrigiert.
 12) L. Hörhammer, H. Wagner und B. Salfner, Arzneimittel-Forsch. 13, 33 (1963).
 13) R. Téoule, J. Chopin und C. Mentzer, Bull. Soc. chim. France 1960, 2116.

Umwandlungen von **1** und **2** sowie der Folgeprodukte

a) 450 mg Glykosidgemisch **1/2** wurden in Methanol mit einem großen Überschuß an Diazomethan bei Raumtemp. über Nacht stehengelassen. Diese Behandlung wurde dreimal wiederholt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand an einer Kieselgelsäule (100 g) chromatographiert. Aus dem Chloroform/Methanol(9:1)-Eluat wurde der 1-Trimethyläther 5.3'.4'-Tri-O-methyl-luteolin-7- β -D-glucopyranosid (**6**) erhalten. Der Trimethyläther von Glykosid **2** kam mit Chloroform/Methanol (8:2), aus Methanol schwach gelbe Nadeln des 5.3'.4'-Tri-O-methyl-luteolin-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosids] (**5**) vom Schmp. 197 bis 198°. Ausb. 40 mg.



b) 25 mg **5** wurden mit Pyridin und Acetanhydrid in der üblichen Weise acetyliert. Aus Äthanol farblose Nadeln des Hexaacetats (**7**) vom Schmp. 131—133°. Ausb. 29 mg.



NMR (CDCl₃): CH₃CO δ =1.9—2.2 ppm (18H); Aglykon: CH₃O 3.97 (9H); 3-H 6.62 (s); 6-H 6.48 (d, J = 2 Hz); 8-H 6.72 (d, J = 2 Hz); 5'-H 6.95 (d, J = 8.5 Hz); 2'-H 7.30 (d, J = 2 Hz); 6'-H 7.52 (q, J = 2 u. 8.5 Hz); Rhamnoglucosyl: CH₃ (Rhamnose) 1.23 (d, J = 6 Hz); 2-, 5-, 6-, 6-H (Glucose) und 5-H (Rhamnose) 3.75—4.35; 1-, 3-, 4-H (Glucose) und 1-, 2-, 3-, 4-H (Rhamnose) 4.9—5.5.

c) 50 mg **5** wurden mit 5proz. Salzsäure 2 Stdn. hydrolysiert. Das ausgefallene Aglykon vom Schmp. 326° war nach Misch-Schmp. und IR-Analyse mit authent. 5.7.3'.4'-Tetrahydroxyflavon (**3**, Luteolin) (Lit.¹⁴): Schmp. 328—329.5° identisch. Die Hydrolyselösung wurde mit Amberlite IRA-410 neutralisiert und papierchromatographisch im System Butanol/Pyridin/H₂O (4:1:5) untersucht. D-Glucose R_F 0.20, L-Rhamnose R_F 0.41.

d) Partielle enzymatische Hydrolyse²⁾ von **5** zu **6**: Sporen von *Aspergillus niger* wurden auf einem Malzextrakt enthaltenden Schrägagar bei 31—32° kultiviert. Nach zweimaligem Überimpfen wurden die Sporen in ein Flüssig-Medium, bestehend aus 0.5 g L-Rhamnose, 2.0 g Pepton, 0.5 g K₂HPO₄, 1.0 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄·7 H₂O und 100 ccm Wasser (pH 6.5), eingetragen. Nach zwei Tagen wurden Sporen in der Kultur sichtbar. Es wurde filtriert und ein Citrat-Phosphat-Puffer (pH 6.8) dem Filtrat zugesetzt. Entaktivierung der β -D-Glucosidase durch Erhitzen auf 60° während 90 Min. lieferte die α -L-Rhamnosidase-Lösung.

5 mg **5** wurden in 1 ccm Citrat-Puffer-Lösung (pH 6.8) mit 1 ccm dieser α -L-Rhamnosidase-Lösung über Nacht bei 45° inkubiert. Papierchromatographisch (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5) waren L-Rhamnose (R_F 0.36) und der 5.3'.4'-Trimethyläther von Glykosid **1** (**6**) (R_F 0.45), zum Vergleich hergestellt durch dreimalige Diazomethan-Behandlung von **1**, nachweisbar.

Synthetisches 5.7.3'.4'-Tetrahydroxyflavanon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid], Eriodictyol-7- β -neohesperidosid (**9**): 1.42 g Phloracetophenon-4- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid], hergestellt aus 2-O-Benzoyl-phloracetophenon¹⁵) und α -Acetobromneohesperidose nach einer von uns kürzlich beschriebenen Methode⁷⁾, wurden nach Zemplén und Bogнар¹⁶⁾ in 2.0 ccm Methanol angeschlämmt und bei 0° mit 10.0 ccm 60proz. Kalilauge versetzt. Nach Zusatz von 0.41 g Protocatechualdehyd wurde unter Stickstoff 90 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt und anschließend bei 0° mit 10proz. Salzsäure auf pH 3.5 angesäuert. Das Methanol wurde i. Vak. abgezogen und das Kaliumchlorid mit Aceton gefällt. Nach Einengen des Filtrates wurde die wäbr. Lösung auf eine Perlonssäule (3 × 50 cm) aufgetragen.

¹⁴⁾ St. v. Kostanecki, Ber. dtsh. chem. Ges. **33**, 3410 (1900).

¹⁵⁾ F. W. Canter, F. H. Curd und R. Robertson, J. chem. Soc. [London] **1931**, 1245.

¹⁶⁾ G. Zemplén und R. Bogнар, Ber. dtsh. chem. Ges. **75**, 645 (1942).

Elution mit Wasser bei steigender Konzentration an Methanol ergab beim Verhältnis Methanol/Wasser 1:1 in den Fraktionen 7–8 (à 50 ccm) die Hauptmenge des Glykosids. **9** kristallisierte aus verd. Methanol in sternförmigen Kristallen. Schmp. 190–191° (Lit.⁸): 187–190°). Ausb. 0.57 g (32%).

UV (Methanol p. a.): λ_{\max} 284 m μ (log ϵ 4.31).

$C_{27}H_{32}O_{15}$ (596.6) Ber. C 54.36 H 5.41 Gef. C 54.40 H 5.70

5.7.3'.4'-Tetrahydroxy-flavanon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-nonaacetat, Nona-O-acetyl-eriodictyol-7- β -neohesperidosid: 0.45 g **9** wurden in Pyridin/Acetanhydrid (1:1) über Nacht bei Raumtemp. acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir aus verd. Äthanol 0.64 g (87%) vom Schmp. 124–126°, $[\alpha]_D^{25}$: –35.28° ($c = 1.0$ in Chloroform).

$C_{45}H_{50}O_{24}$ (974.9) Ber. C 55.44 H 5.17 9 COCH₃ 39.74

Gef. C 55.60 H 5.14 COCH₃ 40.23

NMR (CDCl₃): CH₃CO $\delta = 1.95$ –2.2 ppm (18H), 5-, 3', 4'-Acetyl (9H); Aglykon: 3-H 2.78–2.92 (2H); 2-H 5.5 (q, 1H); 6-H 6.39 (d, $J = 2.5$ Hz); 8-H 6.6 (d, $J = 2.0$ Hz); 2', 5'-6'-H 7.3 (m); Rhamnoglucosyl: CH₃ (Rhamnose) 1.22 (d, $J = 6$ Hz); 2-, 5-, 6-, 6-H (Glucose) und 5-H (Rhamnose) 3.8–4.3 (5H); 1-, 3-, 4-H (Glucose) und 1-, 2-, 3-, 4-H (Rhamnose) 5.0–5.45 (7H).

Synthetisches 5.7.3'.4'-Tetrahydroxy-flavon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid], Luteolin-7- β -neohesperidosid (**2**): 0.60 g **9** wurden mit 4 ccm Acetanhydrid und 0.60 g Kaliumacetat acetyliert und mit 0.25 g Jod 15 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde in 100 ccm 0.5proz. eisgekühlte Kaliumjodidlösung getropft, die Mischung nach 3 Stdn. zentrifugiert, der Niederschlag in 10 ccm Methanol aufgenommen und die Lösung durch Zugabe einer geringen Menge Natriumhydrogensulfid entfärbt. Nach Verdünnen mit Wasser entstand ein Niederschlag, der getrocknet und unter Stickstoff mit 2proz. Natriummethylat-Lösung 15 Min. bei 0° behandelt wurde. Nach Neutralisieren mit Eisessig erhielten wir nach Umkristallisieren aus Methanol/Wasser 0.12 g (20%) **2** vom Schmp. 249–251°. Misch-Schmp. mit dem isolierten Glykosid ohne Depression. Die IR-Spektren waren deckungsgleich. Trocknung i. Vak. bei 120°. $[\alpha]_D^{25}$: –97.55° ($c = 1.6$ in Pyridin) (Lit.^{5b}): Schmp. 192–196°, $[\alpha]_D^{25}$: –35°).

UV (Methanol p. a.): λ_{\max} 254 m μ (log ϵ 4.30), 349 (4.34), Infl. 265 (4.26).

$C_{27}H_{30}O_{15}$ (594.5) Ber. C 54.55 H 5.09 Gef. C 54.30 H 5.17

5.7.3'.4'-Tetrahydroxy-flavon-7- β -[2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-nonaacetat, Nona-O-acetyl-luteolin-7- β -neohesperidosid (**8**): 0.30 g **2** wurden in Pyridin/Acetanhydrid (1:1) über Nacht bei Raumtemp. acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir aus Aceton/Methanol feine Nadeln vom Schmp. 249–250°. Ausb. 0.35 g (72%). $[\alpha]_D^{25}$: –44.18° ($c = 0.77$ in Chloroform).

$C_{45}H_{48}O_{24}$ (972.9) Ber. C 55.56 H 4.97 9 COCH₃ 39.81

Gef. C 55.60 H 5.12 COCH₃ 39.05

NMR (CDCl₃): CH₃CO $\delta = 1.95$ –2.25 ppm (18H), 5-, 3', 4'-Acetyl 2.32–2.5 (9H); Aglykon: 3-H 6.62 (s); 6-H 6.76 (d, $J = 2.0$ Hz); 8-H 7.08 (d, $J = 2.0$ Hz); 5'-H 7.36 (d, $J = 8$ Hz); 2', 6'-H 7.65–7.88; Rhamnoglucosyl: CH₃ (Rhamnose) 1.22 (d, $J = 6$ Hz); 2-, 5-, 6-, 6-H (Glucose) und 5-H (Rhamnose) 3.80–4.35 (5H); 1-, 3-, 4-H (Glucose) und 1-, 2-, 3-, 4-H (Rhamnose) 4.90–5.45 (7H).