

55. Veronicosid, ein neues Iridoidglucosid aus *Veronica officinalis* L. (*Scrophulariaceae*)¹⁾2)

von Otto Sticher und Fatma Ü. Afifi-Yazar

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Pharmazeutisches Institut, ETH-Zentrum,
CH-8092 Zürich (Schweiz)

(28. XI. 78)

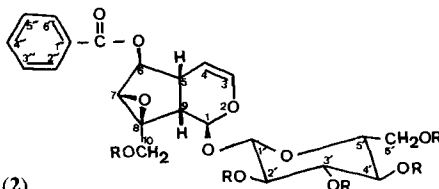
Veronicoside, a new iridoid glucoside from *Veronica officinalis* L. (*Scrophulariaceae*)

Summary

A new iridoid glucoside, Veronicoside (1) has been isolated from *Veronica officinalis* L. The structure of 1 has been determined by chromatographic and spectroscopic analysis as 6-benzoylcatalpol.

Verschiedene *Veronica*-Arten, darunter auch *Veronica officinalis* L. wurden bisher auf das Vorkommen von Iridoidglucosiden geprüft. Winde [3] beschreibt in seiner Dissertation das Vorkommen von Aucubin in verschiedenen *Veronica*-Arten. Wojcik [4] hat aus *Veronica officinalis* Aucubin als Acetat isoliert. Swiatek [5] [6] hat in mehreren *Veronica*-Arten papierchromatographisch Aucubin, Catalpol und Catalposid nachgewiesen. Wieffering [7] fand in *Veronica Anagallis-aquatica* L., *Veronica persica* POIRET und *Veronica serpyllifolia* L. Aucubin und Catalpol und Kooiman [8] ebenfalls in mehreren *Veronica*-Arten die gleichen Iridoidglucoside. Grayer-Barkmeijer [9] hat im Rahmen einer chemotaxonomischen Arbeit über mehrere *Veronica*-Arten in *Veronica officinalis* papierchromatographisch Catalpol und Loganin sowie Ester von Catalpol mit Protocatechuoyl-, Kaffeeoyl-, Vanilloyl-, *p*-Hydroxybenzoyl- und Benzoesäure nachgewiesen.

R = H Veronicosid (1)
R = Ac Veronicosidpentaacetat (2)



Wir haben versucht aus *Veronica officinalis* diese papierchromatographisch nachgewiesenen Iridoidglucoside zu isolieren und mit Hilfe von chemischen und spektroskopischen Methoden zu bestätigen. Es gelang uns neben Aucubin und Catalpol ein neues Iridoidglucosid zu isolieren, für das wir den Namen Veronicosid (1) vorschlagen.

¹⁾ Teil einer Dissertation: F. Ü. Afifi-Yazar (in Bearbeitung).

²⁾ Vorläufige Mitteilung, s. [1] [2].

Ergebnisse und Diskussion. - Von frisch gesammelter *Veronica officinalis* L. erhielt man nach zweimaliger *Craig*-Verteilung aus methanolischer Lösung weisse Kristalle vom Smp. 167,9°, die eine negative *Trim & Hill*-Reaktion [10] gaben. Das IR.-Spektrum (KBr) zeigt die iridoid- und esterspezifischen Banden 1655 cm^{-1} und 1715 cm^{-1} . Die UV.-Spektren von Veronicosid und dessen Pentaacetat zeigen die drei benzoltypischen Maxima bei 205, 232 und 275 nm. Diese Werte stimmen mit denen von reiner Benzoesäure und Benzoesäureäthylester überein (aufgenommen in Äthanol).

¹H-NMR.-Signale (aufgenommen in d₅-Pyridin): Die aromatischen Protonen erscheinen im Verhältnis 2:3 bei 8,14–8,30 bzw. 7,34–7,57 ppm. Die Signale von H–C(3) und H–C(4) liegen bei 6,50 und bei 5,33 ppm als Dublett, H–C(6) erscheint bei 5,09 ppm als Quartett. Die Protonen an C(5) und C(9) liegen zwischen 2,88–3,00 ppm, die Protonen an C(7) und C(10) sind überdeckt im Bereich von 3,78–4,54 ppm mit den Glucoseprotonen zu finden.

Die Tabelle zeigt die ¹³C-NMR. chemischen Verschiebungen (δ ppm) von Veronicosid, Veronicosidpentaacetat, Benzoesäure, Aucubin, Catalpol und von Catalpolhexaacetat.

Tabelle. Chemische Verschiebungen (δ ppm) in den ¹³C-NMR.-Spektren von Veronicosid, Veronicosidpentaacetat, Catalpol, Catalpolhexaacetat, Benzoesäure und Aucubin

C-Atom	Veronicosid (Pyridin-d ₅)	Veronicosid- pentaacetat (CDCl ₃)	Catalpol (CD ₃ OD)	Catalpol- hexaacetat (CDCl ₃)	Benzoesäure [12] (CDCl ₃)	Aucubin (CD ₃ OD)
1	94,41	94,38	95,33	94,22		97,72
3	141,42	141,20	141,78	141,00		141,49
4	101,99	102,12	104,03	101,98		105,72
5	36,15	35,11	39,10	34,93		46,07
6	81,01	80,05	79,58	79,56		82,74
7	59,21	58,75	62,55	58,64		130,27
8	66,78	62,49 ^{a)}	66,23	62,63		147,95
9	42,86	41,58	43,60	41,61		47,89
10	59,96	61,17 ^{a)}	61,60	61,23		61,32
1'	99,79	96,67	99,74	96,59		99,90
2'	74,61	70,67	74,82	70,72		74,81
3'	78,54	72,57	78,54	72,55		78,07
4'	71,16	68,27	71,74	68,34		71,44
5'	77,86	72,29	77,70	72,33		77,77
6'	62,36	62,63	62,90	62,31		62,60
1''	133,40	133,45			133,7	
2''	129,78	129,84			130,2	
3''	128,63	128,51			128,4	
4''	129,92	129,46			129,4	
5''	128,63	128,51			128,4	
6''	129,78	129,84			130,2	
CH ₃ (Ac)		20,57				
CO	166,19	168,97– 170,50				

^{a)} Diese Werte sind gegenüber denjenigen von [2] ausgetauscht.

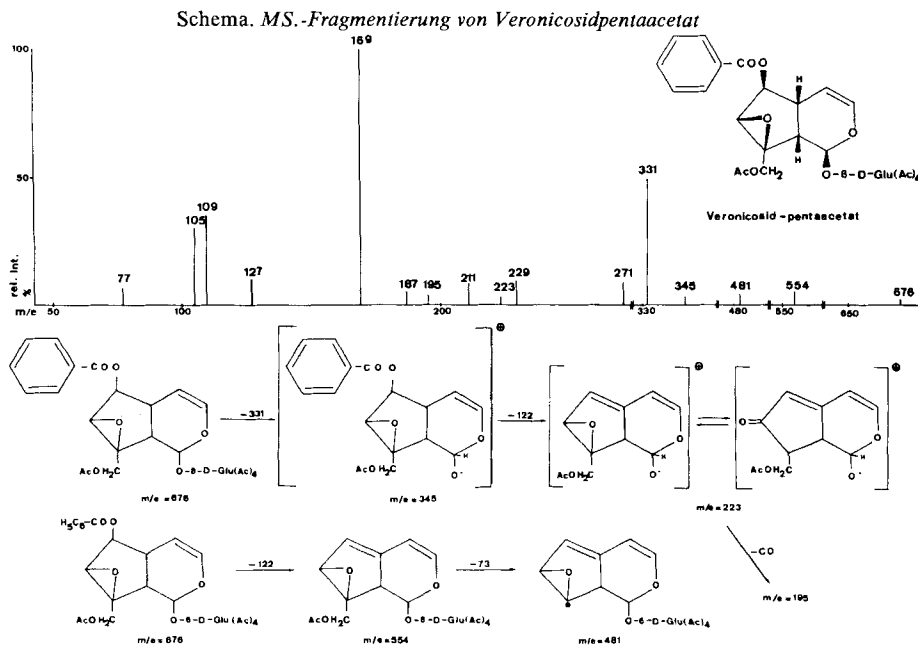
Im MS. von Veronicosid ist das Molekular-Ion $M^+ = 466$ sowie Fragmente der Benzoesäure ($m/e = 122$ (22%), 105 (30%), 77 (10%)) vorhanden. Das Pentaacetat 2 diente zur Ermittlung der Veresterung über C(6).

Veronicosidpentaacetat (**2**), $C_{32}H_{36}O_{16}$ (MG. = 676,63), stellt eine weisse, kristalline Substanz dar, Smp. 172°, IR.-Banden (KBr) bei 1655 (C=C) und 1755 cm^{-1} (C=O Acetat).

Nach Verseifung von Veronicosidpentaacetat konnten mit Hilfe von HPLC. und DC. sowohl Benzoesäure als auch Catalpol nachgewiesen, bzw. isoliert werden.

Im 1H -NMR.-Spektrum von **2** (in $CDCl_3$) liegen die Signale der 5 Acetylgruppen bei 1,98-2,18 ppm. Auch hier erscheinen die aromatischen Protonen im Verhältnis 2:3 bei 7,94-8,12 ppm bzw. 7,36-7,60 ppm. Das Erscheinen der beiden diastereotopen Protonen am C(10) einmal bei 4,02 ppm und dann im Bereich der Glucoseprotonen bei 4,80-5,36 ppm beweist, dass die Veresterung mit der Benzoesäure nicht am C(10) sondern am C(6) stattgefunden hat. Auch im Spektrum von Hexaacetylcatalpol erscheinen diese C(10)-Protonen einmal bei 3,96 ppm und dann bei 4,88 ppm [11]. Wenn die Veresterung am C(10) erfolgt wäre, müssten die Protonen von C(10) im tieferen Feld absorbieren als bei Hexaacetylcatalpol, weil die Benzoylgruppe einen grösseren paramagnetischen Verschiebungseffekt ausübt als die Acetylgruppe.

Im MS. von Veronicosidpentaacetat findet man ausser dem Molekular-Pik ($M^+ = 676$) die typischen Fragmente des acetylierten Zuckers ($m/e = 331$ (52%), 289, 271 (10%), 247, 229, 211, 187, 169 (100%), 127, 109), Bruchstücke der Benzoesäurespaltung ($m/e = 105$ (30%), 77 (8%)) und des acetylierten Iridoidrestes, welche nach der Spaltung der O,C(1')-Bindung entstanden sind ($m/e = 345$, 223,



195). Diese Fragmentierungen sowie die Bruchstücke m/e 554 und $m/e=481$ sind neben dem $^1\text{H-NMR.}$ -Spektrum ein weiterer Beweis für die Veresterung der Benzoessäure mit dem C(6) des Catalpolgerüsts.

Aufgrund der vorliegenden chromatographischen und spektroskopischen Resultate handelt es sich bei Veronicosid um ein 6-Benzoylcatalpol.

Experimenteller Teil

1. Allgemeine Angaben. - *Apparate.* Die Schmelzpunkte wurden mit einer *Mettler* Schmelzpunktapparatur FP 5/FP 52, die optischen Drehungen mit einem *Perkin-Elmer* Polarimeter 141 bestimmt. Die UV.-Spektren wurden mit einem *Beckman* Spektrophotometer Modell 25 (Angaben in nm ($\log \epsilon$)), die IR.-Spektren mit einem *Perkin-Elmer* IR.-Spektrophotometer Modell 257 (Angaben in cm^{-1}), die $^1\text{H-NMR.}$ -Spektren mit einem *Varian* Spektrograph Modell HA 100 bei 100 MHz, die $^{13}\text{C-NMR.}$ -Spektren mit einem *Varian* Spektrograph Modell XL-100-12 bei 25,2 MHz (Angaben in δ (ppm) bezogen δ (internes TMS)=0) und die MS.-Spektren wurden mit einem *Hitachi* *Perkin-Elmer* RMU 6M aufgenommen. Für die Gegenstromverteilung verwendeten wir das Modell Boy 505 (*Fa. Labortec*) und für die Lyophilisation die Gefriertrocknungsanlage Modell EF 3 (*Fa. Edwards*).

Materialien. Für DC. wurden DC.-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (*Fa. Merck*), für SC Kieselgel 60, Korngrösse 0,063–0,200 mm (70–230 mesh ASTM) (*Fa. Merck*) und Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe I, neutral) (*Fa. Woelm*) gebraucht. Zum Sichtbarmachen der Flecken wurden *Godin*-Reagens und Phloroglucin/Salzsäure-Reagens (standardisiert nach [13]) sowie 10proz. Schwefelsäure in Äthanol und Vanilin/Schwefelsäure (1proz. Vanilinlösung in konz. Schwefelsäure) als Detektionsmittel verwendet.

2. Pflanzenmaterial und Isolierung. - Zur Isolierung wurde im Juni 1976 in Zollikerberg (Schweiz) gesammeltes frisches Pflanzenmaterial (ganze Pflanze samt Blüten, Blättern, Stengel und Wurzeln) verwendet. Die grob geschnittenen Pflanzen wurden portionweise unter Zusatz von Äthanol/Wasser 95:5 in einem Mixer zerkleinert und anschliessend mit Äthanol/Wasser 95:5 2mal je 30 Min. durch Kochen bei 40° unter Rückfluss extrahiert. Die gesammelten Filtrate wurden i.R.V. i.V. eingeengt. Der dunkelgrün-bräunliche Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und zwecks Trennung des ausgefallenen Chlorophylls und der wasserunlöslichen Bestandteile filtriert. Das Filtrat wurde solange mit Petroläther ausgeschüttelt, bis die Petrolätherphase nur noch schwach gelblich war. Dabei wurden das restliche Chlorophyll und die anderen lipophilen Bestandteile entfernt. Nachher wurde ein kleiner Teil des Rohextraktes auf eine Aluminiumoxidsäule aufgetragen und einsickern gelassen. Es wurde solange mit Wasser eluiert bis die Reaktion nach *Trim & Hill* [10] negativ ausfiel. Die vereinigten Eluate wurden eingedampft und zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass einige Flecken des Rohextraktes nach der Aluminiumoxidsäule nicht bzw. recht schwach erscheinen. Wir nehmen an, dass es sich bei diesen um Ester mit aromatischen Phenolsäuren handelt. Aus diesem Grund wurde auf eine Reinigung des Rohextraktes nach dem Aluminiumoxid-Verfahren [14] verzichtet. Der Rohextrakt wurde darauf lyophilisiert und zwecks Vortrennung einer *Craig*-Verteilung mit Essigester/Äthanol/Wasser 403:220:390 unterworfen. Es resultierten 5 Fraktionen:

Fraktion I (Verunreinigungen); Fraktion II (Zucker und Substanzen mit $R_f > 0,1$); Fraktion III (Substanzen mit $R_f = 0,25-0,30$); Fraktion IV (Substanzen mit $R_f = 0,32-0,35$); Fraktion V (Substanzen mit $R_f = 0,4$ und grösser).

Nach Säulenchromatographie über Kieselgel mit Butanol/Methanol/Wasser 70:5:20 und mit Butanol/Wasser 9:1 erhielten wir aus Fraktion II Aucubin und Catalpol, welche durch Vergleich mit authentischem Material (Smp., Misch-Smp., IR., $^1\text{H-NMR.}$ - und $^{13}\text{C-NMR.}$ -Spektroskopie) identifiziert wurden.

Die Fraktionen IV und V wurden gemischt und einer zweiten *Craig*-Verteilung mit Wasser/Methanol/Äthanol/Chloroform 2:1:1:3 unterworfen. Bei dieser zweiten *Craig*-Verteilung wurden 4 Fraktionen gesammelt, wobei Substanzen mit sehr nahe liegenden R_f -Werten in verschiedene Fraktionen getrennt wurden. Veronicosid kristallisierte bereits in Gegenwart von anderen Substanzen aus methanolischer Lösung der Fraktion 2 aus. Nach der Kristallisation ist Veronicosid sehr schwer löslich in heissem Methanol. Es konnte nach 2maligem Umkristallisieren rein erhalten werden.

3. Dünnschichtchromatographische Analyse. - Mit den folgenden Laufmitteln wurden sowohl der Gesamtextrakt als auch die einzelnen Fraktionen der *Craig*-Verteilung auf das Vorhandensein

von Iridoidglucosiden untersucht: 1. Methylenchlorid/Methanol/Wasser 40:10:1; 2. Essigester/Methanol/Wasser 100:16,5:13,5; 3. Methylenchlorid/Methanol 9:1; 4. Butanol/Methanol/Wasser 14:1:4; 5. Butanol/Äthanol/Wasser 40:11:19; 6. Butanol/Wasser 9:1; 7. Essigester/Methanol 4:1; 8. Chloroform/Benzol/Methanol/Essigsäure 3:1:1:1; 9. Chloroform/Benzol/Methanol 3:1:0,1; 10. Aceton.

Einige dieser Laufmittelgemische dienten auch zur säulenchromatographischen Weiterverarbeitung der Fraktionen der *Craig*-Verteilung. Als Sprühreagentien wurden die bereits erwähnten Detektionsmittel verwendet.

Bei butanolhaltigen Laufmitteln wurden Aucubin und Catalpol mit Phlorogluzin/HCl als Sprühreagens identifiziert. Für die dünn-schichtchromatographische Untersuchung der Ester-glucoside verwendeten wir hauptsächlich Laufmittelgemische mit Essigester und für die Acetate Chloroform/Benzol/Methanol 3:1:0,1.

4. Reindarstellung von Veronicosid. - Da Veronicosid schon bei der *Craig*-Verteilung auskristallisierte, erübrigte sich die säulenchromatographische Reinigung. Durch Umkristallisieren in abs. Methanol wurden weissliche Kristalle erhalten, Smp. 167,9°, $C_{22}H_{26}O_{11}$ (MG. = 466,45). - UV. ($\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$): 205 (4,09), 232 (4,18), 275 (3,02). - IR. (KBr): 3380 (OH), 1715 (Ester-carbonyl), 1655 (C(3)=C(4)). - $^1\text{H-NMR}$. (d_5 -Pyridin): 2,88-3,00 (*m*, 2H, H-C(5), H-C(9)); 5,09 (*d* × *d*, *J* = 4 Hz/6 Hz, 1H, H-C(6)); 5,33 (*d*, *J* = 7 Hz, 1H, H-C(4)); 5,48-5,64 (2H, H-C(1), H-C(1')); 6,50 (*d*, *J* = 7 Hz, 1H, H-C(3)); 7,34-7,57 (3H, arom.); 8,14-8,30 (2H, arom.); 3,86-4,54 (*m*, H-C(7), H-C(10) mit den Glucoseprotonen).

5. Acetylierung von Veronicosid. - Das Gemisch von 200 mg Veronicosid mit der gleichen Menge abs. Pyridin und Essigsäureanhydrid wurde 1 Std. bei RT. gerührt und über Kieselgel mit Chloroform/Benzol/Methanol 3:1:0,1 chromatographiert. Es resultierten 270 mg Veronicosidpentaacetat, das aus abs. Äthanol kristallisierte (Smp. 172°), $C_{32}H_{36}O_{16}$ (MG. = 676,64). $[\alpha]_D^{20} = -104,96$ (*c* = 0,64; CHCl_3). - UV. ($\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$): 205 (4,18), 231 (4,21), 275 (3,11). - IR. (KBr): 1655 (C=C), 1755 (C=O Acetyl). - $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): 1,98-2,18 (5 × OCOCH_3); 2,62-2,72 (*m*, 2H, H-C(5) und H-C(9)); 3,79 (*s*, 1H, H-C(7)); 3,68-3,80 (*m*, 1H, H-C(5')); 4,02 und 5,07 (*AB*-System, *J* = 13 Hz, 2H, H-C(10)); 4,28 (*t*, 2H, H-C(6')); 4,80-5,27 (*m*, H-C(1), H-C(4), H-C(6) und die Glucoseprotonen); 6,33 (*d*, *J* = 6 Hz, 1H, H-C(3)); 7,36-7,60 (3 arom. H); 7,94-8,12 (2 arom. H).

6. Verseifung von Veronicosidpentaacetat. - Eine kleine Menge Veronicosidpentaacetat wurde in genügender Menge 0,1N NaOH in Methanol gelöst und über Nacht (*ca.* 15 Std.) bei RT. gerührt. Anschliessend wurde mit 0,1N HCl neutralisiert und bis zur wässrigen Lösung eingeeengt. Nach SC. an Kieselgel mit Methylenchlorid/Methanol/Wasser 40:10:1 wurden sowohl Catalpol als auch Benzoesäure in getrennten Fraktionen gesammelt und zu weiteren Prüfungen (DC., HPLC.) verwendet.

Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] O. Sticher & F. Ü. Afifi-Yazar, *Planta med.* 32A, 45 (1977).
- [2] O. Sticher, 11th International Symposium on Chemistry of Natural Products, Golden Sands, Bulgaria, 17-23 September 1978, Symposium Papers, Volume 4, Part 2, in press.
- [3] E. Winde, Diss. Universität Berlin 1959.
- [4] E. Wojcik, *Acta Polon. pharm.* 30, 195 (1973).
- [5] L. Swiatek, *Acta Polon. pharm.* 30, 203 (1973).
- [6] L. Swiatek, Diss. Pharm. Pharmacol. 20, 543 (1968).
- [7] J. H. Wieffering, *Phytochemistry* 5, 1053 (1966).
- [8] P. Kooiman, *Acta bot. Neerl.* 19, 329 (1970).
- [9] R. J. Grayer-Barkmeijer, *Biochem. System.* 1, 101 (1973).
- [10] A. R. Trim & R. Hill, *Biochem. J.* 50, 310 (1952).
- [11] K. Weinges, K. Künstler & G. Schilling, *Liebigs Ann. Chem.* 1975, 2190.
- [12] Le Roy F. Johnson & W. C. Jankowski, 'Carbon-13 NMR. Spectra', John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto 1972.
- [13] O. Sticher & A. Weisflog, *Pharmac. Acta. Helv.* 50, 394 (1975).
- [14] O. Sticher & U. Junod-Busch, *Pharmac. Acta. Helv.* 50, 127 (1975).