

RHAMNAZIN- UND RHAMNETIN-3-O-TRIOSIDE AUS *RHAMNUS PETIOLARIS*

H. WAGNER, M. ERTAN und O. SELIGMANN

Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

(Eingegangen 19. Oktober 1973. Angenommen 1. November 1973)

Key Word Index—*Rhamnus petiolaris*; Rhamnaceae; flavonol-3-O-triosides; Rhamnazin and Rhamnetin glycosides.

Abstract—From the fruits of *Rhamnus petiolaris* two new flavonol-3-O-triosides were isolated and identified as rhamnazin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopyranoside and rhamnetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopyranoside, respectively.

IN DEN methanolischen Extrakten der Früchte von *Rhamnus petiolaris* (Bois.), eines in Mittelanatolien heimischen Strauches,¹ lassen sich dünnschichtchromatographisch mindestens 6 Flavonoidglykoside nachweisen. Davon haben wir zwei Triglykoside (F_1 und F_2), die sich chromatographisch sehr ähnlich verhielten, durch fraktionierte Extraktion im Soxhlet, Polyamidsäulenchromatographie und präparative Dickschichtchromatographie in reiner Form isoliert.

Die saure Hydrolyse von F_1 (Smp. = 158–160°) lieferte als Flavonaglukon den Quercetin-3',7-O-dimethyläther (Rhamnazin)(1), während F_2 (Smp. = 179–181°) den Quercetin-7-O-monomethyläther (Rhamnetin) (2) ergab. Die Zucker waren in beiden Fällen Galactose und Rhamnose.

Zur Strukturaufklärung von F_1 und F_2 wurden beide Glykoside nach Hakomori² permethyliert und anschließend hydrolysiert. Der Nachweis von 5,7,3',4'-Tetra-O-methyl-Quercetin als einzigem Flavonoidmethyläther sprach in beiden Glykosiden für die 3-Position als einziger Glykosidierungsstelle. Aus den Hydrolysaten wurden die partiell methylierten Monosaccharid-Gemische abgetrennt und die vier nachgewiesenen Methyläther durch Reduktion und anschließende Acetylierung in die Methylalditolacetate übergeführt.³ Nach Reinigung und Trennung des Acetatgemisches über die GC-Kolonne wurden die in Tabelle 1 angegebenen Aldite über ihre Retentionszeiten sowie durch Massenspektroskopie identifiziert.

Da nach partieller Hydrolyse von F_1 und F_2 in beiden Fällen Robinobiose (6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-galactopyranose) nachgewiesen werden konnte, muß für die mittelständige Rhamnose in den Trisacchariden von F_1 und F_2 die Pyranoseform angenommen werden. Eine terminale Rhamnose war aus den MS der PMÄ (m/e 189) ableitbar. In

¹ DAWIS, P. H. (1963) *Flora of Turkey*, University Press, Edinburgh.

² HAKOMORI, S. (1964) *J. Biochem.* **55**, 205.

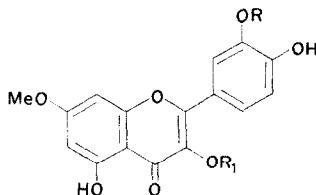
³ BJÖRNDAL, H., HELLERQUIST, C. G., LINDBERG, B. und SVENSSON, S. (1970) *Angew. Chem.* **82**, 643.

den MS der Peracetate von F_1 und F_2 waren übereinstimmend starke Dirhamnosefragmente (m/e 503) nachweisbar.

TABELLE 1
R₇-Glu = 2,3,4,6-TETRO-*O*-METHYL-1,5-DI-*O*-ACETYL-GLUCIT = 1,0

F_1	Aldit 1	0,46	2,3,4-Tri- <i>O</i> -methyl-1,5-di- <i>O</i> -acetyl-rhamnit
	Aldit 3	0,88	2,3-Di- <i>O</i> -methyl-1,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-rhamnit
	Aldit 4	3,32	2,3,4-Tri- <i>O</i> -methyl-1,5,6-tri- <i>O</i> -acetyl-galaktit
F_2	Aldit 1	0,46	2,3,4-Tri- <i>O</i> -methyl-1,5-di- <i>O</i> -acetyl-rhamnit
	Aldit 2	0,73	3,4-Di- <i>O</i> -methyl-1,2,5-tri- <i>O</i> -acetyl-rhamnit
	Aldit 4	3,31	2,3,4-Tri- <i>O</i> -methyl-1,5,6-tri- <i>O</i> -acetyl-galaktit

Über die Bindung der Galaktose an das Aglucon sowie über die Konfiguration der Zucker geben die NMR-Spektren der freien Glykoside Aufschluß. Die Dublette bei $\delta = 5,51$ für F_1 bzw. 5,39 ppm für F_2 (J 7–8 Hz) für das CH-1-Proton sind beweisend für die β -glykosidisch gebundene Galactose am 3-Hydroxyl des Flavonols. Die beiden bei höherem Feld als breite Singulette erscheinenden Rhamnose-CH-1-Protonen bei $\delta = 4,80$ und 4,48 für F_1 bzw. 4,89 und 4,55 ppm für F_2 lassen eine α -L-Konfiguration in den interglykosidischen Anomeriezentren, verbunden mit einer 1C_4 -Konformation, erkennen. Hieraus ergeben sich als Strukturen für F_1 Rhamnazin-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6)]- β -D-galaktopyranosid (3) und für F_2 Rhamnetin-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6)]- β -D-galaktopyranosid (4).



- (1) R = Me; R₁ = H (F_1) (3) R = Me; R₁ = Gal $\xrightarrow{6 \rightarrow 1}$ Rha_p $\xrightarrow{4 \rightarrow 1}$ Rha
 (2) R, R₁ = H (F_2) (4) R = H; R₁ = Gal $\xrightarrow{6 \rightarrow 1}$ Rha_p $\xrightarrow{2 \rightarrow 1}$ Rha

Das Glykosid F_1 könnte mit dem von Liebermann und Hörmann⁴ bzw. Nystrom und Mitarb.⁵ aus *Rhamnus infectoria* isolierten, bisher aber nur hinsichtlich der Zuckersequenz, nicht aber in ihrer Verknüpfungsweise aufgeklärten Rhamnazin-*O*-triosid identisch sein.

Das Glykosid F_2 besitzt große Ähnlichkeit mit dem erstmals von Kane⁶ sowie Perkin und Everest⁷ aus *Rhamnus infectorius* isolierten und von Gellatly,⁸ Tanret⁹ und Attree und Perkin¹⁰ näher untersuchten "Xanthorhamnin." Es kann aber hiermit nicht identisch sein, da Schmid und Mitarb.¹¹ auf Grund eingehender massenspektroskopischer Untersuchungen nur die beiden Alternativstrukturen Rhamnetin-3-*O*-Gal $\xrightarrow{6 \rightarrow 1}$ Rha_p $\xrightarrow{4 \rightarrow 1}$ Rha oder Rhamnetin-3-*O*-Gal $\xrightarrow{6 \rightarrow 1}$ Rha_p $\xrightarrow{5 \rightarrow 1}$ Rha für möglich halten.

⁴ LIEBERMANN, C. und HÖRMANN, O. (1878) *Ber. Chem.* **11**, 952; *Annal.* (1879) *Annal.* **196**, 299.

⁵ NYSTROM, C. H., HOWARD, W. L. und WENDER, S. H. (1957) *J. Org. Chem.* **22**, 1272.

⁶ KANE, Phil. Mag. **23**, 3; (1843) *Chem. Jahresber.* **24**, 508.

⁷ PERKIN, A. G. und EVEREST, A. E. (1918) *The Natural Org. Col. Matters*, S. 107, Longman, Green, London.

⁸ GELLATLY, (1858) *Edinb. New Phil. J.* **7**, 252.

⁹ TANRET, CH. und TANRET, G. (1899) *Compt. Rend.* **129**, 725.

¹⁰ ATTREE, G. F. und PERKIN, A. G. (1927) *J. Chem. Soc.* **234**.

¹¹ SCHMID, R. D., VARENNE, P. und PARIS, R. (1972) *Tetrahedron* **28**, 5037.

Vergleichbar ist Glykosid F_2 nur mit dem ersten Strukturvorschlag, da dieser ebenso wie F_2 eine mittelständige Rhamnose in der Pyranoseform enthält. Nachdem kürzlich Pratviel-Sosa und Mitarb.¹² aus *Rhamnus cathartica* L. ein Trisaccharid mit einer *O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-galactopyranose-Struktur isoliert haben, scheint nunmehr sicher, daß das "Xanthorhamnin" in der Natur in mehreren Modifikationen vorkommt. Da auch Gage und Wender¹³ sowie Nystrom und Mitarb.⁵ festgestellt haben, daß kommerzielles Xanthorhamnin ein Gemisch aus mindestens drei verwandten Triglykosiden darstellt, schlagen wir vor, die verschiedenen sich vom Quercetin ableitenden 3-Galacto-rhamnorhamnoside mit Xanthorhamnin A, B und C usw. zu bezeichnen. Das von Schmid und Mitarb.¹¹ untersuchte Glykosid wäre demnach Xanthorhamnin A, Glykosid F_2 = Xanthorhamnin B und Glykosid F_1 = Xanthorhamnin C.

Deutlich verschieden von den Glykosiden der Xanthorhamnin-Reihe sind die sich vom Kämpferol ableitenden, ebenfalls von Schmid und Mitarb.¹¹ näher untersuchten Rhamno-zitrin-*O*-trioside aus *Rhamnus cathartica* (Catharticin)^{14,15} und *Rhamnus alaternus* (Alaternin).¹⁶

EXPERIMENTELLES

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch nach Kofler, die NMR-Spektren mit dem Varian A-60A (60 MHz), die Gaschromatogramme mit dem Packard, Typ 7500, und die Massenspektren mit dem MS 30 AEI bestimmt bzw. aufgenommen. Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Labor unseres Instituts angefertigt. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelfertigplatten F_{254} (Merck) benutzt. Zur Säulenchromatographie benutzten wir Polyamide und Kieselgel (0,05–0,2 mm) (Merck). Zur Papierchromatographie diente Papier 2043b Schleicher + Schüll. Die Chromatogramme wurden absteigend entwickelt. Folgende Laufmittelsysteme wurden für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie verwendet: (A) EtOAc-HCO₂H-H₂O (10:2:3); (B) EtOAc-MeOH-H₂O (100:16,5:13,5); (C) *i*-PrOH-CHCl₃-MeOH-H₂O (5:5:2:2); (D) C₆H₆-Me₂CO (2:1); (E) MeOH-EtOAc (80:20); (F) C₆H₆-HCO₂H-pyridin (36:9:5), Laufmittelsystem für die Papierchromatographie; (G) *n*-BuOH-AcOH-H₂O (1:1:2). Sprühreagenzien für Flavone: basische Bleiacetatlösung; für die Zucker: Aniliphthalatlösung.

Isolierung und Trennung der Flavonglykoside. 150 g Droge wurden mit Äther, Äthylacetat und zuletzt mit Methanol im Soxhlet extrahiert. Das Methanol wurde bis zur Trockene abdestilliert. Auswaage: 10 g getrockneter Extrakt. Dieser Extrakt wurde über eine Polyamidsäule (ϕ 5,5 cm, Höhe 30 cm) aufgetrennt und mit Laufmittel E eluiert. Die Fraktionen 9–22 (je 25 ml) wurden gesammelt, das Lösungsmittel abdestilliert und aus MeOH-BuOH 50:2 umkristallisiert. Auswaage Mischkristallisat ($F_1 + F_2$): 4,2 g. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus isoPrOH-EtOH 1:1 blieben 3,3 g $F_1 + F_2$ -Gemisch vom Schmelzpunkt 190–195°. Davon wurden 400 mg durch präparative DC auf 10 Kieselgelplatten F_{254} (Schichtdicke 2 mm) getrennt. Laufmittel C. Elution mit Methanol. Ausbeute 75 mg F_1 , 135 mg F_2 .

F_1 . Gelbe Kristalle vom Schmp. = 158–160°, R_f : 0,29 mit Laufmittel A, 0,30 mit Laufmittel B. (C₃₅H₄₄O₂₀ · 3H₂O (838,7). Ber.: C, 50,12; H, 5,99; H₂O, 6,48. Gef.: C, 47,40; H, 5,04%; H₂O, 6,00%) $[\alpha]_D^{23}$ –50,0° (MeOH; c 0,2335); UV (Methanol p.a.) 255, 268 (sh), 355 nm (MeOH + NaOAc) 263, 300 (sh), 417 nm; IR (in KBr) Carbonyl: 1650 cm⁻¹; NMR: (CD₃)₂SO, TMS int. (CF₃COOD-Zusatz): Aglucon: 2'-H δ = 8,05 ppm (*d*, *J* 2 Hz, 1 Pr); 6'-H 7,61 (*q*, *J* 9 und 2, 1 Pr); 5'-H 6,95 (*d*, *J* 9, 1 Pr); 8-H 6,71 (*d*, *J* 2, 1 Pr); 6-H 6,38 (*d*, *J* 2, 1 Pr); 3',7-OCH₃ 3,91 (*s*, 6 Pr); Zucker: CH-1-Gal 5,51 (*d*, *J* 7, 1 Pr); CH-1-Rha 4,80 (*s*, br, 1 Pr); CH-1-Rha 4,48 (*s*, br, 1 Pr); CH 3,0–4,15 (*m*, 14 Pr); CH₃-6-Rha 1,06 (*d*, *J* 6, 6 Pr);

F_2 . Gelbe Kristalle vom Schmp. = 179–181°, R_f : 0,21 mit Laufmittel A, 0,26 mit Laufmittel B. (C₃₄H₄₂O₂₀ · 3H₂O (824,7). Ber.: C, 49,52; H, 5,85; H₂O, 6,54. Gef.: C, 48,35; H, 5,28; H₂O, 6,20%). $[\alpha]_D^{23}$ –37,7° (MeOH; c 0,223); UV (MeOH p.a.) 257, 269 (sh) 361 nm. (Methanol + NaOAc) 265, 300 (sh) 420 nm. IR (in KBr) Carbonyl 1640 cm⁻¹. NMR: (CD₃)₂SO, TMS int. (CF₃COOD-Zusatz): Aglucon: 2',6'-H δ = 7,58–7,91 ppm (*m*, 2 Pr); 5'-H 6,99 (*d*, *J* 9, 1 Pr); 8-H 6,72 (*d*, *J* 2, 1 Pr); 6-H 6,42 (*d*, *J* 2, 1 Pr); 7-OCH₃ 3,93 (*s*, 3 Pr); Zucker: CH-1-Gal 5,39 (*d*, *J* 8, 1 Pr); CH-1-Rha 4,89 (*s*, 1 Pr); CH-1-Rha 4,55 (*s*, 1 Pr); CH 3,2–4,0 (*m*, 14 Pr); Me-Rha 1,09 (*d*, *J* 6, 3 Pr); Me-Rha 1,16 (*d*, *J* 6, 3 Pr).

¹² PRATVIEL-SOSA, F., WYLDE, R., BOURBONZE, R. und PERCHERON, F. (1973) *Carbohydr. Res.* **28**, 109.

¹³ GAGE, T. B. und WENDER, S. H. (1950) *Ann. Chem.* **22**, 708.

¹⁴ PARIS, R. und QUIRIN, M. (1960) *Compt. Rend.* **250**, 2448.

¹⁵ PLOUVIER, V. (1967) *Compt. Rend.* **265**, 2120.

¹⁶ FAUGERAS, G. und PARIS, R. (1962) *Ann. Pharm. Fr.* **20**, 217.

Hydrolyse von F_1 und F_2 durch Säure. Jeweils 20 mg Substanz wurden in 15 ml 1 N H_2SO_4 gelöst und drei Stunden bei 80° stehengelassen. Nach dem Abkühlen wurde filtriert, die wässrige Phase mit $CaCO_3$ neutralisiert und abzentrifugiert. Das Aglucon von F_1 war mit Rhamnazin (Smp. 214°), F_2 mit Rhamnetin (Smp. 234°) identisch. Die IR-Spektren waren deckungsgleich. Die Zucker zeigten gleichen R_f -Wert mit D-Galaktose (R_f 0,35) und mit L-Rhamnose (R_f 0,52) im Laufmittel G.

Permethylierung von F_1 und F_2 . 100 mg NaH und 0,3 ml Dimethylsulfoxid wurden 1 Stunde bei 65–70° unter Stickstoffatmosphäre stehengelassen. Zu dieser Lösung wurden jeweils 10 mg F_1 bzw. F_2 gegeben und das Ganze mit dem Magnetführer etwa 20 Minuten gerührt. Anschließend wurde mit Methyljodid im Überschuß versetzt und die Mischung über Nacht weiter gerührt. Dann wurde abfiltriert, das Chloroform abdestilliert und das sirupöse Produkt mittels Dünnschichtchromatographie mit Laufmittel D, R_f : 0,68 für F_1 -PMÄ, 0,60 für F_2 -PMÄ untersucht.

Acetylierung von F_1 und F_2 . Je 25,0 mg wurden mit Pyridin- Ac_2O über Nacht acetyliert und in üblicher Weise aufgearbeitet.

F_1 -decaacetat. $(C_{55}H_{64}O_{30})$ (1205,1) Ber: C, 54,87, H, 5,36, Gef: C, 55,3; H, 5,34%. $[\alpha]_D^{26} -56,8^\circ$ (c 0,6563, $CHCl_3$); NMR ($CDCl_3$, TMS int.) Aglucon: 2'-H $\delta = 7,90$ ppm (d, J 2 Hz, 1 Pr); 6'-H 7,58 (q, J 9 und 2, 1 Pr); 5'-H 7,14 (d, J 9, 1 Pr); 8-H 6,85 (d, J 2,5, 1 Pr); 6-H 6,63 (d, J 2,5, 1 Pr); 3',7'- OCH_3 4,0 und 3,93 (s, 6 Pr); 5-OAc 2,46 (s, 3 Pr); 4'-OAc 2,33 (s, 3 Pr); Zucker: CH-1,2,3,4-Gal, CH-2,3-Rha, CH-2,3,4-Rha 4,95–5,60 (m, 9 Pr); CH-1 Rha 4,88 (s, br, 1 Pr); CH-1-Rha 4,55 (s, br, 1 Pr); CH-5,6,6-Gal, CH-4,5-Rha, CH-5-Rha 3,0–4,1 (m, 6 Pr); OAc 1,97–2,18 (s, 24 Pr); Me-Rha 1,22 (d, J 6, 3 Pr); Me-Rha 1,15 (d, J 6, 3 Pr).

F_2 -undecaacetat. $(C_{56}H_{64}O_{31})$ (1233,1) Ber: C, 54,59; H, 5,24, Gef: C, 54,59; H, 5,11%. $[\alpha]_D^{26} -64,2^\circ$ (c 0,946, $CHCl_3$), NMR ($CDCl_3$, TMS int.) Aglucon: 2,6'-H $\delta = 7,95$ ppm (m, 2 Pr); 5'-H 7,30 (d, J 9, 1 Pr); 8-H 6,81 (d, J 2,5, 1 Pr); 6-H 6,60 (d, J 2,5, 1 Pr); 7-OMe 3,90 (s, 3 Pr); 5-OAc 2,43 (s, 3 Pr); 3',4'-OAc 2,30, 2,32 (s, 6 Pr); Zucker: CH-1,2,3,4 Gal, CH-3,4-Rha, CH-2,3,4-Rha 4,95–5,55 (m, 9 Pr); CH-1-Rha 4,89 (s, br, 1 Pr); CH-1-Rha 4,56 (s, br, 1 Pr); CH-5,6,6-Gal, CH-2,5-Rha, CH-5-Rha 3,15–4,10 (m, 6 Pr); OAc 1,97–2,18 (s, 24 Pr); Me-Rha 1,15 (d, J 6, 3 Pr); Me-Rha 1,08 (d, J 6, 3 Pr).

Hydrolyse der Permethylprodukte. Je 6 mg Permethylprodukt F_1 -PMÄ bzw. F_2 -PMÄ wurden mit 5 ml 2 N H_2SO_4 versetzt und 4 Stunden unter Rückfluß gekocht (Temperatur etwa 100°). Nach der Hydrolyse wurde das Aglucon (5,7,3',4'-Tetra-O-Methyl-Quercetin) abfiltriert, das Filtrat mit $CaCO_3$ neutralisiert, zentrifugiert, mit 20 ml Aceton gewaschen, anschließend nochmals zentrifugiert, um den letzten Rest $CaCO_3$ zu entfernen und mit Kohle geklärt. Danach wurde das Aceton abdestilliert. Als Rückstand verblieb eine gelbliche Flüssigkeit.

Bereitung der Methylalditolacetate und GC-MS-Analyse. Das Gemisch der partiell methylierten Zucker wurde 2 Stunden mit 50 mg $NaBH_4$ in 5 ml Wasser reduziert und das Reaktionsprodukt anschließend nach den von Björndal¹⁷ beschriebenen Verfahren acetyliert. Man löst das Methylalditol-zucker-acetat-Gemisch in 1 ml Chloroform und unterwirft es der GC. Säulenmaterial: ECNSS-M 3% (Silicon-Cyanäthyl) auf GaschromQ (Applied Science Laboratories) (100–120 mesh). Säulentemperatur: 160° isotherm, β -Strahlen-Argon-Ionisations-detektor, Beckman-R II C Fraction Collection System GCP-O. Es wurden 4 Alditol-Acetate abgetrennt und über eine geheizte Leitung durch mehrmalige Kondensation in Glaskapillaren aufgefangen. Diese wurden direkt zur MS verwendet. Direkt-Einlaß ES-Ionenquelle 100°; 70 eV/4 KV/300 μA .

Aldit 1. m/e 43 (100% rel. Int.); 41 (16), 45 (30), 59 (12), 71 (13), 72 (32), 88 (20), 89 (40), 101 (80), 115 (38), 117 (44), 131 (60), 161 (32), 175 (10), 233 (2, 4), 292 (0, 4). **Aldit 2.** m/e 43 (100% rel. Int.); 45 (20), 59 (10), 72 (15), 75 (12), 87 (20), 88 (16), 99 (30), 101 (40), 115 (14), 117 (40), 129 (25), 131 (50), 145 (10), 161 (15), 175 (10), 177 (8), 189 (10), 233 (10). **Aldit 3.** m/e 43 (100% rel. Int.); 45 (14), 58 (8), 71 (10), 72 (10), 85 (10), 87 (14), 89 (23), 99 (20), 101 (40), 117 (57), 127 (11), 129 (14), 131 (40), 159 (6), 161 (11), 173 (7), 189 (7), 201 (7), 203 (6), 233 (26). **Aldit 4.** m/e 43 (100% rel. Int.); 45 (14), 71 (13), 87 (32), 88 (13), 99 (60), 101 (64), 117 (86), 29 (55), 131 (43), 159 (18), 161 (27), 173 (18), 189 (26), 233 (26), 260 (3,6), 350 (0,8).

Anerkennungen—Herr Dr. M. Ertan, Pharmazeutisch-Chemisches Institut der Universität Ankara, dankt der Carl-Duisberg-Stiftung für das ihm gewährte Forschungsstipendium. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt unser Dank für großzügige Sachbeihilfen.

¹⁷ BJÖRNDAL, H., LINDBERG, B. und SVENSSON, S. (1967) *Carbohydr. Res.* **5**, 433.