

STRUKTUR DER MICROPHYLLINSÄURE AUS DEM HARZ VON *CONVOLVULUS MICROPHYLLUS**

HILDEBERT WAGNER und GERALD SCHWARTING

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität, 8 München 2, Deutschland

(Eingegangen 31 August 1976)

Key Word Index—*Convolvulus microphyllus*; Convolvulaceae; microphyllic acid; rhamnoglucosyl-penta-saccharide of 11-hydroxypalmitic acid.

Abstract—The structure of microphyllic acid, the main glycosidic acid from the ether soluble resin of *Convolvulus microphyllus* has been elucidated as the *O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-fucopyranoside of 11-hydroxypalmitic acid, using mainly GLC and mass spectrometry of the derivatized sugars.

Der Ätherextrakt des Krautes von *Convolvulus microphyllus*, einer im Orient und in Indien als Abführmittel verwendeten Droge [1], liefert ein Harzglykosidgemisch, das durch Alkalihydrolyse in eine Hauptglykosidsäure und einige Begleitsäuren gespalten wird. Die Isolierung der Hauptverbindung, die wir Microphyllinsäure nennen, erfolgte durch Kieselgelchromatographie und Reinigung über das Acetat. Das amorphe Acetat schmolz bei 76–78° und wies eine optische Drehung von -44.2° in CHCl_3 auf. Der hieraus durch Na-Methylat-Behandlung erhaltene Microphyllinsäuremethylester schmolz bei 193–195° und zeigte eine optische Drehung von -62.9° in H_2O .

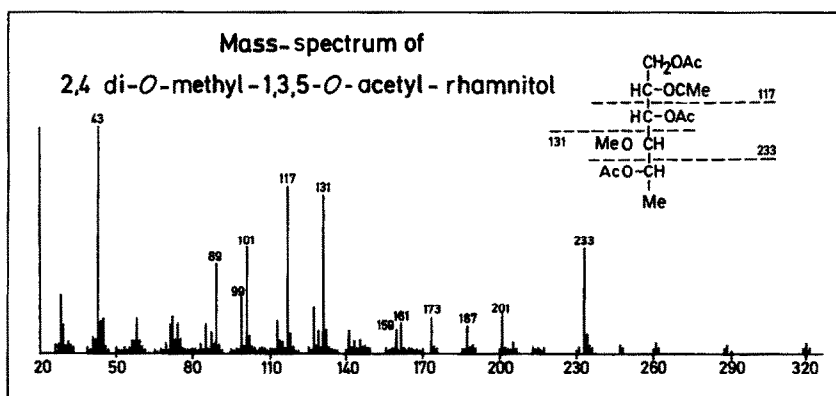
Das der Microphyllinsäure zugrundeliegende Aglykon konnte durch Schmelzpunkt, NMR- und Massenspektroskopie eindeutig also die 11-Hydroxypalmitinsäure (Jalapinolsäure) identifiziert werden. Nach dem Mol-Gewicht der Glykosidsäure mußte der Zuckeranteil aus einem Tetra- oder Pentasaccharid bestehen. Die qualitative und quantitative Zuckeranalyse ergab pro Mol Hydroxyfettsäure 1 Mol Glucose, 1 Mol Fucose und 3 Mol Rhamnose. Da durch partielle Hydrolyse der Glykosidsäure mit 70%iger Ameisensäure nach einer

Methode von Kawasaki [2] ein 11-Hydroxypalmitinsäure-*O*-mono-fucosid entstanden war, mußte die Fucose direkt an die Fettsäure gebunden sein. Zwei andere Glykosidsäuren mit verkürzter Oligosaccharidkette, die aus dem Hydrolyseansatz isoliert werden konnten, lassen darauf schliessen, daß auf die Fucose L-Rhamnose als zweiter und D-Glucose also dritter Zucker folgen müssen, wenn das Saccharid geradkettig aufgebaut ist.

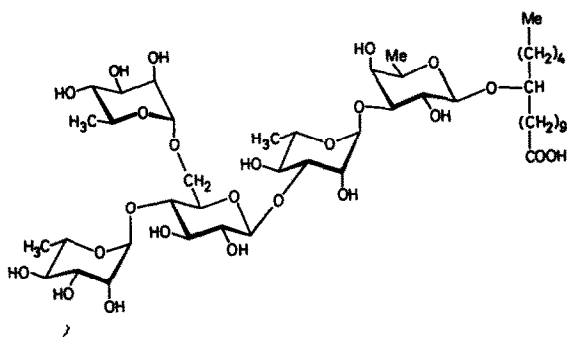
Aus dem Acetolyseansatz der Glykosidsäure wurde außerdem ein Glucose und Rhamnose enthaltendes Disaccharid isoliert, das weder mit α - oder β -Scillabiose noch mit Rutinose oder Neohesperidose identisch war. Rhamnose war nach dem Ergebnis der Borsäurereduktion der reduzierende Teil. Für eine 1 \rightarrow 3 Verknüpfung sprach der Befund, daß nach dem Smith-Abbau [3] der Microphyllinsäure nur Rhamnose erhalten wurde, da 1 \rightarrow 3 Verknüpfungen von Perjodat nicht angegriffen werden. Das gleiche Disaccharid ist u.a. auch bei der Acetolyse der Operculinsäure aus *Ipomoea operculata* (1. Mitteilung) erhalten worden.

Die Verknüpfung und Sequenz der Zucker am Ende der Kette in der Microphyllinsäure wurde nach Permethylierung direkt über die Methylzucker bzw. die Alditolacetate geklärt. Nachgewiesen wurden 2,3-Di-*O*-methyl-1,4,6-tri-*O*-acetyl-glucitol, 2,3,4-Tri-*O*-methyl-1-mono-*O*-acetyl-rhamnitrit, ein Di-*O*-methyl-tri-*O*-acetyl-

* Part 2 in the series 'Chemie der Convolvulaceen Harze' for Part 1, see preceding paper.



rhamnitols und ein Di-O-methyl-tri-O-acetylfucitol. Die Massenspektroskopie [4] lieferte für die zwei letzten Alditole nahezu identische Spektren mit einem Hauptpeak bei m/e 117 und zwei starken Peaks bei m/e 131 und 233. Diese Fragmentierung ist nur erklärbar bei Vorliegen von 2,4-Dimethyl-methylpentosen (Abb. 1). Daraus folgt, daß die beiden Rhamnosen einmal $1 \rightarrow 3$, ein zweites Mal $1 \rightarrow 6$ mit der Glucose verknüpft sind. Für die Verknüpfung der beiden Pentosen am Anfang der Kette ergibt sich die gleiche $1 \rightarrow 3$ Verknüpfung wie für die mittelständige Rhamnose mit der Glucose. Wenn man annimmt, daß die Fucose in der Microphyllinsäure ebenso wie in den bisher isolierten Glykosidsäuren [5] und Herzglykosiden β -D-Konfiguration besitzt, kommt man zu nachstehendem Formelvorschlag.



Microphyllinsäure wäre demnach eine α -O-L-Rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-fucopyranosid der Jalapinosäure. Sie unterscheidet sich in der Zuckerzusammensetzung und im Molekulargewicht deutlich von allen anderen bisher aufgeklärten Glykosidsäuren (siehe 1. Mitteilung). Die Glykosidsäure liegt auch bei diesem Harz genium mit kurzkettigen Fettsäuren verestert vor. Bei der gaschromatographischen Analyse der Säuren, die nach der Na-Methylat-Verseifung des Harzglykosidgemisches erhalten wurden, konnten Tiglin-, Essig-, Propion-, Valerian-, Isovalerian- und Iso-Buttersäure identifiziert werden.

EXPERIMENTELLES

Die Droge wurde von der Fa. Zandu, Pharm. Works Ltd., Bombay, geliefert. Sprühreagenzien für die DC: (1) 50%ige H_2SO_4 in EtOH (Glykosidsäureacetate) (2) 0.006%ige Rhodamin 6-G und 2N NaOH (1:1) (Glykosidsäuremethylester). Betrachtung im Sichtbaren bzw. im UV-Licht.

Isolierung der Microphyllinsäure. 1 kg gepulverte Droge wurde 24 Stdn. am Soxhlet mit 4 l Äther erschöpfend extrahiert und bei 45° bis zur Sirupdicke eingengt. Ausbeute 32 g. Eine Lösung von 20 g Ätherextrakt in 75 ml Methanol wurde nach Zusatz von 2 ml N-NaOMe (pH 8–9) 12 Stdn. bei 4° und anschließend 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure wurde die Lösung mit 400 ml Wasser verdünnt und dreimal mit je 150 ml Et_2O ausgeschüttelt. Die Ätherlösung enthielt die kurzkettigen Fettsäuren. Die $MeOH-H_2O$ -Phase wurde zur Trockene eingengt, der Rückstand in 15 ml H_2O aufgenommen und mit einem Überschuss an Aceton versetzt. Der Niederschlag wurde bei 5000 U/Min. abzentrifugiert. Nach dem Trocknen erhielten wir 4.8 g eines gelblichen Pulvers. 5 g des Pulvers wurden in $CHCl_3-MeOH-H_2O$ (65:25:4) aufgenommen und an einer Kieselgelsäule mit dem gleichen Laufmittel chromatographiert. Die Hauptmenge des Microphyllinsäuremethylesters wurde bei einer Fraktionierung à 20 ml in den Fraktionen 80–120 erhalten.

Nach dem Einengen wurde ein hellgelbes Pulver erhalten. Ausbeute 0.55 g. 0.5 g des fast reinen Glykosidsäuremethylesters wurden in 5 ml Pyridin gelöst und nach Zusatz von 50 ml Ac_2O 15 Min. am siedenden Wasserbad erhitzt. Nach 24-stündigem Stehen wurde das Acetat in 1 l Eiswasser gegossen und der Niederschlag abgenußt (0.35 g). Zur Reinigung wurde das Acetat an einer Kieselgelsäule mit Benzol-Aceton (1:1) chromatographiert. Ausbeute 0.28 g.

Microphyllinsäureacetat (amorph). Smp. 76–78° [α]_D²⁴ –44.2° ($c = 0.9597$ in $CHCl_3$) $C_{71}H_{110}O_{36}$ (1539.6°) Ber. C 55.39

H 7.15 Gef. C 55.60 H 6.76. IR (in KBr): $>C=O$ 1720 cm^{-1} .

Microphyllinsäuremethylester (amorph). 0.1 g Acetat wurden in 10 ml Methanol p.A. gelöst, einige Tropfen N-NaOMe zugesetzt und in üblicher Weise aufgearbeitet. Ausbeute 60 mg. Smp. 193–195° [α]_D²² –62.9° ($c = 0.873$ in H_2O) $C_{47}H_{86}O_{24}$ (1034.7) Ber. C 54.64 H 8.31 Gef. C 51.2 H 7.29; IR (in KBr):

$>C=O$ 1700 cm^{-1} ; OH 3200–3500 cm^{-1} ; DC: Kieselgel: $CHCl_3-MeOH-H_2O$ (65:25:4) R_f 0.40 R.: im UV-Licht nach Rhodamin-R-Zusatz gelber Fleck auf rosa Grund.

11-Hydroxy-palmitinsäuremethylester (Jalapinosäuremethylester): 0.1 g Microphyllinsäureacetat wurden wie in der 1. Mitteilung beschrieben mit methanolischer Schwefelsäure hydrolysiert und die isolierte Fettsäure in Äther mit CH_2N_2 methyliert. Die Reinigung erfolgte durch präparative DC über Kieselgel-Pyranin (14:5)-Platten im System Äther-Petrol (3:7) R_f 0.65. Kristallisation aus Äther-Hexan (1:1). Smp. 43–44°. Ausbeute ca 10 mg. $C_{27}H_{54}O_2$ (M^+ , 286); MS: m/e 286 (rel. Int. 0.4%, 255 (5), 215 (46), 186 (51), 183 (100), 157 (7), 143 (38), 129 (12), 115 (5), 101 (18), 87 (62), 83 (42), 74 (40), 69 (35), 55 (71), 41 (50). IR (in KBr): $c = 1760$ cm^{-1} ; OH 3420 cm^{-1} . NMR: (TMS int.): Me $\delta = 0.89$ (3 H, t, $J = 5.0$ Hz); CH_2 $\delta = 1.32$ (24 H, s, br); OH $\delta = 1.52$ (1 H, s); $-CH_2-$ $\delta = 2.29$ (2 H, t, $J = 7$ Hz); $-OC_{11}H$ $\delta = 3.56$ (1 H, s, br); OMe $\delta = 3.63$ (3 H, s). GC: SE-30 3% $t = 180^\circ$, R_i 8.0 Min (Bezugs-S., α -OH-Palmitinsäure-Me).

Permethylierung und Darstellung der Methylzucker-alditolacetate: 60 mg Microphyllinsäuremethylester wurden wie in der 1. Mitteilung beschrieben permethyliert, hydrolysiert und die partiell methylierten Zucker reduziert und acetyliert. GC: ECNSS-M 3% (Silicon-Elastomer) auf Gaschrom. Q 100–200 mesh $t = 165^\circ$ isotherm; also Standard diente 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol (R_{TG} 1); folgende Verbindungen wurden gefunden: 2,3-Di-O-methyl-1,4,6-tri-O-acetylglucitol (R_{TG} 5.4); 2,3,4-Tri-O-Methyl-1-mono-O-acetyl-rhamnitols (R_{TG} 0.5); 2,4-Di-O-methyl-1,3,5-tri-O-acetyl-rhamnitols (R_{TG} 0.98); 2,4-Di-O-methyl-1,3,5-tri-O-acetyl-fucitol (R_{TG} 1.3); die Identifizierung der zwei letzten Alditolacetate erfolgte durch kombinierte präp. GC und MS; 2,4-Di-O-methyl-1,3,5-tri-O-acetyl-rhamnitols: MS: M^+ m/e 320 (rel. Int. 5%), 233 (48), 201 (18), 187 (12), 173 (16), 161 (13), 159 (10), 141 (10), 131 (71), 127 (21), 117 (74), 113 (14), 101 (48), 99 (25), 89 (40), 85 (13), 72 (16), 71 (12), 58 (16), 45 (16), 44 (14), 43 (100), 28 (26). Ein anderer Teil des Permethylierungsproduktes wurde zuvor mit 1N H_2SO_4 hydrolysiert und das Gemisch der Methylzucker nach Neutralisation direkt auf Kieselgel 60 F_{254} im System Benzol-EtOH (4:1) untersucht. R_f 0.09 = 2,3-Di-O-methyl-glucose; R_f 0.19 und R_f 0.27 Di-O-methyl-Rhamnose bzw. Fucose. R_f 0.57 = 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-glucose.

Acetolyse der Microphyllinsäure. 0.1 g Microphyllinsäureacetat wurden wie in der 1. Mitteilung beschrieben der Acetolyse unterworfen. Das Gemisch der Oligosaccharidacetate wurde durch präparative DC auf Kieselgel-60 HF-254 Fertigplatten Merck im System Benzol-EtOAc (5:4) von der Hauptmenge der Monosaccharidacetate getrennt. Anschließend Entacetylierung mit 1N NaOMe wie in der 1. Mitteilung und PC in Bu-Ei-Wa (4:1:2) lieferte drei Flecke: R_f 1.0; 1.20; 1.45. Nach präparativer PC-Isolierung der Verbindungen (je ca 10–15 mg) erfolgte die Identifizierung durch Hydrolyse, Reduktion und über die Alditolacetate. Fleck I: Glucorhamnosylrhamnose; Fleck II: 3-O- α -L-Glucosylrhamnose; Fleck III: Rhamnose. Das Disaccharid aus Fleck II ergab nach Reduktion mit Natrium-

borhydrid Glucose und Rhamnitol. Es war chromatographisch in mehreren Systemen mit dem gleichen Disaccharid aus der Operculinsäure (vorangegangene Mitteilung) identisch.

Perjodatoxidation von Microphyllinsäure. 10 mg Microphyllinsäure wurden in 2.0 ml H_2O gelöst, 50 mg $NaJO_4$ in 2 ml H_2O bei 5° zugegeben und nach 20 Stdn. $NaBH_4$ (5 mg/ml) zugefügt. Nach dem Stehen über Nacht wurde mit Essigsäure neutralisiert, mit 1 N H_2SO_4 hydrolysiert, mit $BaCO_3$ neutralisiert und auf DC im $Me_2CO-MeOH-CHCl_3-H_2O$ (10:4:2:1) untersucht: Einziger nachweisbarer Zucker war Rhamnose (R_f 0.80).

Partielle Hydrolyse von Microphyllinsäure. 50 mg Microphyllinsäure wurden in 70%iger Ameisensäure (90° , 30') nach der Methode von Kawasaki [2] hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde auf DC im System $CHCl_3-MeOH-H_2O$ (7:3:1) untersucht. Die 7 nachgewiesenen Flecke wurden durch Testsubstanzen bzw. über die Hydrolyseprodukte identifiziert. Fleck 1: (R_f 0.93) Jalapinolsäure; Fleck 2 (R_f 0.87) Jalapinolsäure + Fucose; Fleck 3 (R_f 0.75) Jalapinolsäure + Fucose + Rhamnose; Fleck 4 (R_f 0.57) Jalapinolsäure + Fucose, Rhamnose + Glucose; Flecken 5, 6 und 7 (R_f 0.5, 0.46, 0.37) Jalapinolsäure + Fucose, Rhamnose + Glucose.

Quantitative Zuckerbestimmung. 50 mg Microphyllinsäure wurden mit 2.0 ml 1 N H_2SO_4 3 Stdn. unter Rückfluß hydrolysiert. Nach Abtrennung der Fettsäure wurde die wässrige Phase zur Trockene eingeengt (11,825 mg), der Rückstand in 5.0 ml H_2O gelöst und aliquote Mengen neben entsprechenden

Mengen von Standardzuckern (Glucose, Rhamnose, Fucose-Monohydrat) auf DC Kieselgel 60 F-254 (Merck) chromatographiert. Laufmittel: Bu-Ei-Wa (4:1:2). Die Zuckerflecke wurden indirekt durch Besprühen der Ränder mit konz. H_2SO_4 markiert. Nach Entnahme von den Platten und Elution mit Wasser wurden die Zucker nach der Anthron-Methode [6] (0.2%ige Anthronlösung in 95%iger Schwefelsäure) bestimmt. Messung bei 625 nm. Gef. Zuckerverhältnis: Rhamnose/Glucose/Fucose = 3.14/1.0/1.08.

Kurzkettige Säuren des Glykosidharzgemisches. Die Isolierung und gaschromatographische Identifizierung erfolgte analog der 1. Mitteilung.

LITERATUR

1. Cooke, T. (1908) *The Flora of the Presidency of Bombay*, S. 229. Taylor and Francis, London.
2. Okabe, H., Koshito, N., Tanaka, K. und Kawasaki, T. (1971) *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 2394.
3. Hay, G. W., Lewis, B. A. und Smith, F. (1965) *Methods in Carbohydrate Chemistry*, V, (Whistler, R. L., ed.) S. 381. Academic Press, New York.
4. Björndal, H., Lindberg, B. und Svensson, S. (1967) *Carbohydr. Res.* **5**, 43.
5. Kawasaki, T., private Mitteilung.
6. Mallov, J. (1953) *J. Biol. Chem.* **201**, 825.