

INHALTSSTOFFE VON *METASEQUOIA* GLYPTOSTROBIDES—II.

FLAVON- UND FLAVONOLGLYKOSIDE¹

S. BECKMANN und H. GEIGER

Chemisches Institut der Universität (Landwirtschaftliche Hochschule), Stuttgart-Hohenheim

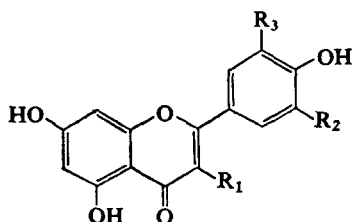
(Received 21 February 1968)

Zusammenfassung—Aus dem Herbstlaub von *Metasequoia* wurden die 7-Glucoside von Apigenin, Luteolin und Tricetin, sowie die schon von anderen Autoren gefundenen 3-Rhamnoside von Kämpferol, Quercetin und Myricetin isoliert.

Abstract—The 7-glucosides of apigenin, luteolin and tricetin as well as the previously reported 3-rhamnosides of kaempferol, quercetin and myricetin have been isolated from the autumnal leaves of *Metasequoia*.

ÜBER die Flavonglykoside der Blätter von *Metasequoia* lagen bislang nur widersprechende Angaben vor. So gaben M. Takahashi *et al.*^{2a} einmal Glykoside von Kämpferol, Quercetin, Isorhamnetin und Myricetin an, in einer weiteren Arbeit^{2b} finden dagegen dieselben Autoren nur das Quercitrin. Um eine Klärung des Sachverhalts herbeizuführen, haben wir die Flavonglykoside in unsere Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von *Metasequoia* einbezogen.

Kurztriebe von *Metasequoia*, die im Herbst im Exotischen und im Botanischen Garten in Stuttgart-Hohenheim gesammelt worden waren, wurden mit Methyläthylketon-Wasser extrahiert. Durch Säulenchromatographie der Extrakte an Polyamid und Cellulose, sowie durch Gegenstromverteilung ist es uns gelungen, die 7-Glucoside von Apigenin (I), Luteolin (II) und Tricetin (III), sowie die 3-Rhamnoside von Kämpferol (IV), Quercetin (V) und Myricetin (VI) in reiner kristalliner Form zu isolieren. Ein Isorhamnetinglykosid konnten wir nicht finden. Wir möchten jedoch das Vorkommen in Exemplaren, die unter anderen klimatischen Bedingungen gewachsen sind, nicht ausschliessen.



- I: $R_1 = R_2 = R_3 = H$
II: $R_1 = R_2 = H; R_3 = OH$
III: $R_1 = H; R_2 = R_3 = OH$
IV: $R_1 = OH; R_2 = R_3 = H$
V: $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$
VI: $R_1 = R_2 = R_3 = OH$

Die Identifizierung der einzelnen Glykoside erfolgte auf chromatographischem Wege, da die uns zur Verfügung stehenden Vergleichspräparate meist nicht schmelzpunktrein waren

¹ I. MITT.: S. BECKMANN und H. SCHÜHLE, *Z. Naturforsch.* **23b**, 471 (1968).

² M. TAKAHASHI, T. ITO und A. MIZUTANI, *J. Pharm. Soc. Japan* **80**, (a) 1488, (b) 1557 (1960).

TABELLE 1. R_f -WERTE DER FLAVON- UND FLAVONOLGLYKOSIDE UND AGLYKONE AUS *Metasequoia*

Substanz	Wasser	Essigsäure/Wasser						Ph/W*	BEW†	Fluorescenz	
		5:95	10:90	15:85	20:80	40:60	60:40			Unbehandelt	NA‡
Apigenin (I)	0,00	0,01	0,03	—	0,13	0,42	0,67	0,96	—	dunkler Fleck	grün
Apigenin-7-glucosid (Cosmosiin)	0,02	0,06	0,12	0,22	0,29	0,59	0,77	0,95	0,54		
Luteolin (II)	0,00	0,01	0,02	0,05	0,06	0,28	0,52	0,76	0,76		gelb
Luteolin-7-glucosid	0,01	0,03	0,06	0,12	0,15	0,45	0,61	0,77	0,28		
Tricetin (III)	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02	0,15	0,34	0,44	0,54	matt gelbgrün	grün
Tricetin-7-glucosid	0,01	0,01	0,03	0,07	0,09	0,28	0,45	0,50	0,14		
Kämpferol (IV)	0,00	0,01	0,02	—	0,05	0,22	0,46	—	—	matt gelbgrün	orange
Kämpferol-3-rhamnosid (Afzelin)	0,11	0,20	0,28	0,38	0,43	0,69	0,79	0,85	0,80	dunkler Fleck	
Quercetin (V)	0,00	0,01	0,01	—	0,03	0,14	0,31	—	—	matt gelbgrün	orange
Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	0,09	0,17	0,24	0,33	0,40	0,63	0,71	0,69	0,68	dunkler Fleck	
Myricetin (VI)	0,00	0,00	0,01	—	0,02	0,08	0,17	—	—	matt gelbgrün	orange
Myricetin-3-rhamnosid (Myricitrin)	0,08	0,15	0,20	0,28	0,35	0,58	0,63	0,49	0,47	dunkler Fleck	

Die Chromatogramme wurden auf Schleicher-Schull-Papier 2045 b gew. aufsteigend entwickelt.

* Ph/W = wassergesättigtes Phenol.

† BEW = *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (v:v:v).

‡ NA = mit 1-proz. Naturstoffreagens A (Diphenylborsäure- β -aminoäthylester) in Methanol besprüht.

und da diese Glykoside je nach der Art des Umkristallisierens mit verschiedenen Mengen Kristallwasser kristallisieren. In Tabelle 1 sind die R_f -Werte sämtlicher Glykoside und der daraus durch Cellulasespaltung³ erhaltenen Aglyka zusammengefasst. Die Zuckeranteile wurden in bekannter Weise durch Papier- und Dünnschichtchromatographie identifiziert; auf eine Angabe der R_f -Werte wird verzichtet.

Mit Ausnahme von Luteolin-7-glucosid, Tricetin-7-glucosid und Myricetin-3-rhamnosid stand uns von allen in Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen Vergleichsmaterial zur Verfügung, das ausnahmslos dieselben R_f -Werte zeigte wie die aus *Metasequoia* isolierten Verbindungen. Für die 3 oben genannten Glykoside von II, III und VI war, nachdem die Elementaranalyse ergeben hatte, daß es sich um Monoside handelt, nur noch der Ort der Glykosylierung zu beweisen.

Die 3-Stellung des Zuckers im Myricetin-3-rhamnosid ergab sich aus der Feststellung, daß diese Substanz auf dem Papierchromatogramm unter der u.v.-Lampe als dunkler, die Eigenfluorescenz des Papiers löschender Fleck erscheint, wie dies für Flavone und Flavonol-3-glykoside charakteristisch ist.³

Auch das Luteolinglucosid erscheint auf dem Papierchromatogramm unter der u.v.-Lampe als dunkler Fleck. Das beweist, daß die Hydroxylgruppe in 5-Stellung frei ist, denn das 5-Glucosid zeigt, wie alle Flavone ohne freie Hydroxylgruppe in 5-Stellung, eine starke Eigenfluorescenz.⁴ Das Vorliegen einer freien *o*-Dihydroxygruppierung ergibt sich aus dem Befund, daß der Komplex des Glucosids mit Diphenylborsäure⁵ die gleiche tiefgelbe Fluoreszenzfarbe zeigt wie das Aglykon. Der Komplex eines 3'-oder 4'-Glycosids müßte eine grüne Fluorescenz zeigen, wie etwa Apigenin, da in diesem Fall kein zweites Molekül Diphenylborsäure komplex gebunden werden kann. Ferner erscheint das Glykosid nach Besprühen mit Benedicts Reagens im u.v.-Licht als dunkler, die Fluorescenz des Papiers löschender Fleck. Auch dieser Befund beweist das Vorliegen einer freien *o*-Dihydroxygruppierung, denn ein Flavon mit nur einer oder keiner freien Hydroxylgruppe würde eine grünlichgelbe Fluorescenz zeigen.⁶ Demnach kann es sich nur um ein Luteolin-7-glucosid handeln.

Beim Tricetinglucosid ergibt sich das Vorliegen einer freien 5-Hydroxylgruppe und einer freien *o*-Dihydroxygruppierung in derselben Weise wie bei Luteolinglucosid. Dass alle drei Hydroxylgruppen in 3'-, 4'- und 5'-Stellung frei sind, zeigt die leichte Oxydierbarkeit des Glykosid in alkalischer Lösung durch Sauerstoff: beim Übergießen mit verdünnter Natronlauge entstehen sofort braune Zersetzungsprodukte. Das Luteolin-7-glucosid dagegen löste sich in derselben Natronlauge mit gelber Farbe, die über Stunden erhalten bleibt. Dasselbe unterschiedliche Verhalten zeigen bekanntlich auch die 3-Glykoside der entsprechenden Flavonole V und VI.⁷ Mithin ist auch die Konstitution des Tricetin-7-glucosids gesichert.

VERSUCHE

Isolierung der Glykoside

500 g lufttrockenes Herbstlaub von *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng. wurden erst mit Petroläther, dann mit Äther vorextrahiert und anschliessend in einem Durchfluss-extraktor 3 Tage mit dem azeotropen Gemisch aus Methyläthylketon und Wasser extrahiert.

³ S. BECKMANN und H. GEIGER, *Phytochem.* 2, 281 (1963).

⁴ J. B. HARBORNE, *Phytochem.* 6, 1569 (1967).

⁵ R. NEU, *Naturwissenschaften* 43, 82 (1956).

⁶ H. REZNIK und K. EGGER, *Z. Anal. Chem.* 183, 196 (1961).

⁷ L. JURD, in T. GEISSMAN, *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, p. 127. Oxford (1962).

Der Extrakt wurde im Vacuum zur Syrupkonsistenz eingeengt, der Rückstand (ca. 65 g) in 100 ml Aceton gelöst, mit 100 ml Polyamid* verrührt und unter starkem Rühren mit 1 l. Wasser verdünnt. Die Suspension wurde auf eine 8 × 100 cm Polyamidsäule* gegeben. Nach dem Einsickern der Lösung wurde nacheinander mit je 2 l. 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80- und 90-proz. wässrigem Aceton eluiert und das Eluat in Fraktionen zu je 25 ml aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Cellulose mit 40-proz. Essigsäure als Fliessmittel untersucht. Die ersten 9,5 l. Eluat enthielten keine Flavonoide, dann folgten 0,9 l., die die 3 Flavonglucoside, das Myricetin-3-rhamnosid sowie einen Teil des Quercetin-3-rhamnosids enthielten (P 1). Hierauf folgten 1,1 l., die die Hauptmenge des Quercetin-3-rhamnosids, Kämpferol-3-rhamnosid und Spuren nicht näher charakterisierter Flavonoide enthielten (P 2). Die folgenden Fraktionen bestanden im wesentlichen aus den Resten verschiedener Biflavone, die der Ätherextraktion entgangen waren und nicht näher untersucht wurden.

Die weitere Trennung der Glykosidfraktionen P 1 und P 2 erfolgte auf Cellulosesäulen mit Aceton/Wasser/Eisessig (20:80:5) als Fliessmittel. Das Cellulosepulver (Macherey & Nagel Nr. 2214) wurde mit Hilfe eines Vibromischers im Fliessmittel suspendiert und dann in eine 8 × 100 cm-Säule eingeschlämmt. Der Eindampfrückstand von P 1 (3,5 g) wurde heiss in 100 ml des Fliessmittels gelöst, mit Cellulosepulver zu einem dünnen Brei verrührt und nach dem Abkühlen auf die Säule gegeben. Die ersten 1,95 l. Eluat enthielten keine Flavonoide, dann folgten 75 ml, die nur Quercetin-3-rhamnosid enthielten, anschliessend 0,85 l. einer Quercetin- und Myricetin-3-rhamnosid-Mischfraktion, dann 0,25 l. mit reinem Apigenin-7-glucosid und 0,25 l. mit wenig Apigenin- und Luteolin-7-glucosid, darauf 0,9 l. mit reinem Luteolin-7-glucosid und schliesslich 3 l., die das Tricetin-7-glucosid enthielten. Die einzelnen Fraktionen wurden vom Aceton befreit und, mit Ausnahme der Quercetin- und Myricetin-3-rhamnosid-Mischfraktion, auf 4 × 40 cm Polyamidsäulen gegeben, zunächst mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen und anschliessend die Glykoside mit Aceton/Wasser (1:1) eluiert. Die Quercetin- und Myricetin-3-rhamnosid-Mischfraktion wurde auf eine 8 × 100 cm-Polyamidsäule gegeben und nach dem Durchwaschen mit Wasser mit je 2 l. 20-, 25-, 30-, 35-, 40-, 45- und 50-proz. wässrigem Aceton eluiert, wobei sich das schneller wandernde Myricetin-3-rhamnosid gut von dem langsameren Quercetin-3-rhamnosid abtrennen liess.

Bei P 2 konnten auf der Cellulosesäule nur Verunreinigungen abgetrennt werden. Die 3-Rhamnoside von Kämpferol und Quercetin wurden durch Craigverteilung zwischen Methyläthylketon und Wasser in Gegenwart von Borax und Glycol getrennt.⁸ Die Isolierung der Glykoside erfolgte auch hierbei am besten durch Adsorption aus der im Vacuum vom Methyläthylketon befreiten Lösung an Polyamid, gründliches Waschen mit Wasser und Elution mit Aceton/Wasser (1:1).

Die Feinreinigung der chromatographisch reinen Glykoside erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex LH 20 mit Wasser/Methanol/Aceton (1:1:2) als Elutionsflüssigkeit. Dadurch werden hochmolekulare Verunreinigungen abgetrennt, so dass die Glykoside beim langsamen Verjagen des Lösungsmittels im Vacuum ohne weiteres kristallisieren. Das Sephadex wurde jeweils mit einer Lösung, die 2-proz. Natronlauge und 2-proz. Äthylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz enthielt, gereinigt, da offenbar Spuren der Flavone als Chelatkomplexe sehr fest adsorbiert werden und sich nur mit dieser Lösung entfernen lassen.

* GRISAMID VON CARL ROTH, Karlsruhe, mit Alkohol und Aceton gewaschen, in wässriger Suspension eingeschlämmt.

⁸ H. GEIGER und S. BECKMANN, *Z. Naturforsch.* 20b, 1139 (1965).

Im einzelnen wurden erhalten: *Apigenin-7-glucosid-monohydrat* (*Cosmosiin*). Feine, blassgelbe Nadelchen. Schmp. 220–225° (Lit.⁹: 226–227°). Ausbeute 156 mg (0,03%). *Luteolin-7-glucosid-sesquihydrat*. Kleine, gelbe Nadelchen, die ihr Kristallwasser im Vacuum-exsiccator über Kieselgel schon bei Raumtemperatur verlieren. Schmp. 249–250° (Zers.) (Lit.¹⁰: 258°). (Gef.: H₂O 5,63. Ber. für C₂₁H₂₀O₁₁ · 1½ · H₂O: H₂O 5,69% — Gef.: C 55,97; H 4,59. Ber. für C₂₁H₂₀O₁₁: C 55,25; H 4,50%). Ausbeute 205 mg (0,04%). *Tricetin-7-glucosid-dihydrat*. Blassgelbe Nadelchen, die bei 225–230° sintern und sich dann langsam zersetzen. Beim Übergießen mit verd. Natronlauge lösen sie sich unter Braunfärbung. Ausbeute 94 mg (0,02%). (Gef.: C 50,64; H 4,46. Ber. für C₂₁H₂₀O₁₂ · 2H₂O: C 50,40; H 4,84%). *Kämpferol-3-rhamnosid-sesquihydrat* (*Afzelin*). Kleine, gelbe Blättchen. Schmp. 168–170° (Lit.¹¹: 172–174°, Zers.). Ausbeute 86 mg (0,02%). *Quercetin-3-rhamnosid-sesquihydrat* (*Quercitrin*). Dünne, gelbe Blättchen. Schmp. 176–179° (Lit.¹²: 176–179°). Ausbeute 1,6 g (0,32%). *Myricetin 3-rhamnosid-sesquihydrat* (*Myricitrin*). Blassgelbe, dünne Blättchen. Schmp. 185–187° (Der meist in der Literatur angegebene Schmp. 199–200° kommt dem Monohydrat zu¹³). Ausbeute 348 mg (0,07%). (Gef.: C 51,38; H 4,71. Ber. für C₂₁H₂₀O₁₂ · 1½ · H₂O: C 51,35; H 4,72%).

Die Spaltung der Glycoside in Aglykon und Zucker, die beide papierchromatographisch identifiziert wurden, erfolgte, wie früher beschrieben, mit Cellulase aus *Aspergillus niger*.³ Dabei können die wasserunlöslichen Glykoside erst in Dimethylformamid gelöst und dann mit Puffer und Enzym versetzt werden, denn das Enzym ist in einer Lösung, die 30% Dimethylformamid enthält, noch einwandfrei wirksam.

Vergleichssubstanzen. Luteolin wurde durch Hydrolyse eines Heterosidgemisches aus *Reseda luteola* L. gewonnen. Aus diesem Gemisch wurde auch ein Luteolin-7-glucosid (Schmp. 249–250°) isoliert, das mit dem Präparat aus *Metasequoia* identisch war. Der von anderer Seite¹⁴ für Luteolin-7-glucosid aus *Reseda luteola* angegebene Schmp. 280° dürfte auf das Vorliegen einer anderen Modifikation oder eines anderen Hydrats hinweisen. Tricetin wurde aus käuflichem Tricetin-3',4',5'-trimethyläther durch Entmethylierung mit Pyridiniumchlorid unter Stickstoff dargestellt¹⁵ und über Sephadex LH 20 gereinigt. Kleine, gelbe Täfelchen, die sich oberhalb 300° zersetzen, ohne zu schmelzen. (Gef.: C 56,03; H 3,72. Ber. für C₁₅H₁₂O₈ · H₂O: C 56,26; H 3,78). Kämpferol-3-rhamnosid wurde aus *Afzelia* Holz¹¹ durch Extraktion mit Aceton/Wasser (8:2) und Chromatographieren des eingeeengten Extrakts an Polyamid dargestellt. Myricetin verdanken wir Herrn Dr. Dietrichs, Reinbek bei Hamburg. Die übrigen Glykoside und Aglyka waren käufliche Präparate der Firma Carl Roth, Karlsruhe.

Anerkennung—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die finanzielle Unterstützung, den Herren Prof. Dr. Buchloh und Prof. Dr. Walter für die Überlassung von Pflanzenmaterial, Herrn Dr. Dietrichs und Privatdozent Dr. Gmelin für Vergleichssubstanzen.

⁹ T. NAKAOKI, *J. Pharm. Soc. Japan* **60**, 190 (1940).

¹⁰ H. NAKAMURA, T. OHTA und G. HUKUTI, *J. Pharm. Soc. Japan* **56**, 107 (1936).

¹¹ F. E. KING und R. M. ACHESON, *J. Chem. Soc.* 168 (1950).

¹² L. HÖRHAMMER, H. J. GEHRMANN und L. ENDRES, *Arch. Pharm.* **292/64**, 113 (1959).

¹³ A. G. PERKIN, *Proc. Chem. Soc.* **18**, 11 (1902).

¹⁴ R. R. PARIS, A. GORIS, P. DUQUÉNOIS und M. HAAG, *Compt. Rend.* **262**, 203 (1966).

¹⁵ J. B. HARBORNE und E. HALL, *Phytochem.* **3**, 428 (1964).