

FLAVONOIDE AUS *CICER ARIETINUM* L.

W. HÖSEL und W. BARZ

Biologisches Institut II, Universität Freiburg i.Br., Biochemie der Pflanzen, Schänzelstraße 9-11,
Deutschland

(Received 6 January 1970)

Zusammenfassung—Aus oberirdischen Teilen von *Cicer arietinum* L. wurden die Flavonole Kämpferol, Quercetin und Iisorhamnetin sowie das Isoflavon Pratensein isoliert. Als Hauptglykoside des Kämpferols wurden Kämpferol-3- β -monoglukosid und das bisher unbekannte Kämpferol-3- β -glukoapiosid charakterisiert.

Abstract—The flavonols kaempferol, quercetin and isorhamnetin, together with the isoflavone pratensein, were isolated from aerial parts of *Cicer arietinum* L. The main kaempferol glycosides present were kaempferol-3- β -monoglucoside and the hitherto unknown kaempferol-3- β -glucoapioside.

EINLEITUNG

AUS DER Kichererbse, *Cicer arietinum* L., konnte bisher eine große Zahl phenolischer Inhaltsstoffe isoliert werden. Neben den seit langem bekannten Isoflavonen Formononetin und Biochanin A¹ isolierten Wong, Mortimer und Geissman² die Chalkone Isoliquiritigenin und Isoliquiritigenin-4'-glukosid, das 4',7-Dihydroxyflavonol, die Isoflavone Daidzein, Pratensein und Biochanin-A-glukosid, das Flavanonol Garbanzol sowie p-Cumarsäure. Grisebach und Zilg fanden das Isoflavanon Homoferreirin³ sowie die Cumöstane Medicagol und 12-O-Methylcumöstrol.⁴ Im Rahmen unserer Studien über den Stoffwechsel der Isoflavonoide in der Kichererbse⁵ beschäftigen wir uns auch mit den Flavonoiden und isolierten die Flavonole Kämpferol, Quercetin, Iisorhamnetin, das Kämpferol-3- β -monoglukosid sowie das bisher noch unbekannte Kämpferol-3- β -glukoapiosid. Außerdem erfolgte Identifizierung des schon einmal erwähnten Pratenseins.²

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Isolierung und Identifizierung der Flavonoid Aglyka

Nach saurer Hydrolyse eines Alkoholextrakts der oberirdischen Teile drei Wochen alter *Cicer arietinum* Pflanzen erhielten wir eine ätherlösliche Phenol-Fraktion, die durch präparative Papierchromatographie in den Systemen 1 und 2 (siehe experimenteller Teil) aufgetrennt wurde. Aus einer großen Anzahl phenolischer Stoffe isolierten wir drei im u.v.-Licht (365 nm) stark gelb fluoreszierende Substanzen sowie eine dunkel absorbierende Verbindung.

Nach den in Tabelle 1 angegebenen U.V.-spektroskopischen Daten und vergleichenden chromatographischen Untersuchungen mit den Laufmitteln 1, 2, 3, 5 und 7 erwiesen sich die gelb fluoreszierenden Verbindungen I, II und III als die Flavonole Kämpferol, Quercetin und

¹ J. L. BOSE, P. R. BHANDARI und S. SIDDIQUI, *J. Sci. Ind. Res.* **4**, 310 (1945); **15b**, 325 (1956).

² E. WONG, P. J. MORTIMER und T. A. GEISSMAN, *Phytochem.* **4**, 89 (1965).

³ H. GRISEBACH und H. ZILG, *Z. Naturforsch.* **23b**, 494 (1968).

⁴ H. ZILG und H. GRISEBACH, *Phytochem.* **8**, 2261 (1969).

⁵ W. BARZ, *Z. Naturforsch.* **24b**, 234 (1969); W. BARZ und B. ROTH-LAUTERBACH, *Z. Naturforsch.* **24b**, 638 (1969).

TABELLE 1. ABSORPTIONSMAXIMA DER AUS *Cicer arietinum* L. ISOLIERTEN FLAVONOIDAGLYKA UND FLAVONOIDGLYKOSIDE NACH ZUSATZ
VERSCHIEDENER REAGENZIEN (VERGLEICHEN⁶)

Substanz	MeOH	Lösungsmittel und Zusätze				
		Na-Azetat u. Borsäure	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	Na-Acetylät	
Kämpferol (I)	368, 325, ^a 295, 267	384, 310, 275	368, 325, 295, 267	426, 375, 322, 295	426, 375, 322, 295	405, 343, 302
Quercetin (II)	372, 300, 256	388, 323, 275	388, 260	460, 275	428, 360, 305, 267	410, 325, 273 (instabil)
Isorhamnetin (III)	371, 305, ^a 270, 254	380, 325, ^a 273, 257	371, 305, 270, 254	428, 360, 300, 263	428, 360, 300, 263	420, 334, 283, 250
Pratensein (IV)	290, ^a 263	328, ^a 272	290, 263	372, ^a 310, 274	372, ^a 310, 274	328, ^a 272
Kämpferol-3- β -monoglukosid (V)	350, 267	384, 312, 275	350, 267	398, 350, 306, 275	398, 350, 306, 275	402, 325, 275
Kämpferol-3- β -glukoapiosid (VI)	350, 267	382, 310, 274	350, 267	398, 352, 306, 275	398, 348, 304, 275	398, 325, 274

^a = Schulter.

⁶ L. JURD, in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (Hrsg. T. A. GEISSMAN), Pergamon Press, Oxford (1962); T. MABRY, in *Perspectives in Phytochemistry* (Hrsg. J. HARBORNE und T. SWAIN), Academic Press, London (1969).

Isorhamnetin. Die erhaltenen Proben von Quercetin und Isorhamnetin ergaben nach Permethylierung Quercetinpentamethyläther. Alkaliabbau⁷ unter Stickstoffatmosphäre führte bei Isorhamnetin zu Phloroglucin und Vanillinsäure (chromatographischer Vergleich in den Systemen 1, 8, 9). Die im U.V. dunkelabsorbierende Substanz IV war nach den Daten in Tabelle 1 ein Isoflavon mit freien Hydroxylgruppen in den Positionen 5 und 7. Durch Alkaliabbau⁷ unter Stickstoffatmosphäre erhielt man Phloroglucin und durch alkalische H_2O_2 -Behandlung⁸ Isovanillinsäure. Diese Spaltprodukte sowie die Ergebnisse von massenspektrometrischen Untersuchungen (Molekülion m/e : 300, Retro-Diels-Alder-Spaltung: m/e : 148 und 152/153)⁸ zeigten, daß es sich bei Substanz IV um das Isoflavon Pratensein⁹ handelt.

Isolierung und Identifizierung der Kämpferol-Glykoside

Die durch Alkoholextraktion der oberirdischen Teile drei Wochen alter Kichererbsen erhaltene Mischung von Phenolglykosiden wurde an einer Polyamidsäule durch Gradientenelution mit Wasser-Methanol fraktioniert.¹⁰ Aus einer sehr großen Zahl verschiedener Glykoside wurden zwei Substanzen (V und VI, Tabelle 1) durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel (System 10)¹¹ und weitere Polyamidsäulenchromatographie (als Elutionsmittel Systeme 5 und 6)¹⁰ gereinigt. Als Aglykon von V und VI wurde nach saurer Hydrolyse jeweils Kämpferol nachgewiesen. Als Zucker ließen sich bei V Glukose und bei VI Glukose und Apiose durch Papierchromatographie (Systeme 3, 4) nachweisen. Quantitative Bestimmung der Aglykon-Zucker-Verhältnisse ergaben in mehreren Bestimmungen folgende Werte: (V) Kämpferol:Glukose = 1:0.85 und (VI) Kämpferol-Glukose-Apiose = 1:0.87:0.90.

Bei partieller Hydrolyse mit Trifluoressigsäure¹² (2-proz. Lösung, 0.25 ml, 2 mg Substanz, 15 min bei 100°) wurde VI durch selektive Abspaltung von Apiose in V überführt. Apiose wie auch V wurden in mehreren Chromatographie-Systemen (3, 4 und 6) eindeutig identifiziert.

Bei enzymatischer Hydrolyse von V, VI und dem bei der partiellen Hydrolyse von VI entstandenen Glykosid (VIa) mit β -Glukosidase ergab sich, daß V und VIa sehr schnell gespalten wurden, VI dagegen sehr langsam.

Aus den u.v.-spektroskopischen Daten von V und VI (Tabelle 1) ihrer dunklen u.v.-Absorption auf Chromatogrammen und aus den Ergebnissen der partiellen Hydrolyse ergibt sich, daß bei V und VI die Glukose in 3-Stellung des Flavonols angeknüpft ist und bei VI die Apiose an die Glukose gebunden ist. Bei V handelt es sich demnach um das bekannte Kämpferol-3- β -monoglukosid Astragalin,¹³ während VI das unseres Wissens bisher noch nicht beschriebene Kämpferol-3- β -glukoapiosid ist. Die partielle Hydrolyse von VI sowie die sehr langsam verlaufende Spaltung von VI mit β -Glukosidase spricht wie bei anderen Flavonoidglukoapiosiden für eine Bindung der Apiose an Position 2 der Glukose.¹⁴ Neben dem hier erstmals beschriebenen Vorkommen von Apiose in *Cicer arietinum* L. zeigt die Isolierung des

⁷ J. J. CHIRIKDJIAN, E. JAAG und P. SPIEGL, *Monatshefte Chem.* **100**, 1105 (1969).

⁸ M. SHAMNEA und C. D. STIVER, *Tetrahedron* **25**, 3887 (1969).

⁹ E. WONG, *J. Org. Chem.* **28**, 2336 (1963).

¹⁰ K. EGGER und M. KEIL, *Z. Analyt. Chem.* **210**, 201 (1964).

¹¹ D. B. HARPER und H. SMITH, *J. Chromatog.* **41**, 138 (1969).

¹² H. SANDERMANN, JR. Persönliche Mitteilung.

¹³ S. HATTORI, in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (Hrsg. T. A. GEISSMAN), Pergamon Press, Oxford (1962).

¹⁴ H. SANDERMANN, JR. Persönliche Mitteilung.

Kämpferol-3- β -glukoapiosids einen neuen Typ von Flavonoid-glukoapiosiden, da alle bisher isolierten Glukoapioside 7-O-Glykoside sind.¹⁵

Über die Strukturaufklärung der zahlreichen weiteren isolierten Flavonoidglykoside und Aglyka werden wir später berichten.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Aufzucht der Kichererbsen erfolgte wie beschrieben.⁵

Isolierung der Aglyka

Der Aethanolextrakt grüner Pflanzenteile von *Cicer arietinum* wurde nach Petrolätherbehandlung mit 5-proz. Schwefelsäure unter Methanolzusatz zwei Stunden am Rückfluß hydrolysiert. Präparative Papierchromatographie wurde auf mit 0,01m EDTA-Lösung intensiv gewaschenem Whatman 3M Papier ausgeführt.

Chromatographiesysteme A. Papier mit: 1, Benzol-Eisessig-H₂O = 115:72:3; 2, Essigsäure, 30%; 3, (auch DC Cellulose) n-BuOH-Eisessig-H₂O = 4:1:1; 4, Aethylacetat-Eisessig-H₂O mit Borsäure gesättigt-H₂O = 20:2:1:1. B. DC Polyamid mit: 5, Benzol-Methylnaethylketon-MeOH = 4:2:4; 6, H₂O-Aethanol-Meth. aeth. Keton-Acetylacetone = 65:15:15:5; C. DC Kieselgel mit: 7, Toluol-Aethylformiat-Eisessig = 5:4:1; 8, Eisessig-CHCl₃ = 6:94; 9, Benzol-Dioxan-Eisessig = 90:25:4; 10, Na-wolframat (0,01 m) gepuffert: Aethylacetat-Meth. aeth. Keton-H₂O-Eisessig = 4:3:2:1.

Methylierungen

Permethylierungen erfolgten in Aceton mit K₂CO₃ und CH₃J wie beschrieben.⁶

Isolierung der Glykoside

Der Aethanolextrakt oberirdischer Pflanzenteile wurde nach Petrolätherbehandlung mit Äther zur Entfernung der Aglyka ausgeschüttelt, der wäßrige Anteil auf einer Polyamidsäule (55 x 6,5 cm) adsorbiert und mit einem H₂O-MeOH-Gemisch mit schrittweise steigendem Methanol-Gehalt eluiert. Die Charakterisierung und weitere Reinigung der Fraktionen erfolgte nach Egger.¹⁰

Quantitative Bestimmungen der Glykosid-Komponenten

Hydrolyse der Glykoside erfolgte mit 15%-iger H₂SO₄ unter Methanolzusatz 2 Stunden am Rückfluß. Kämpferol wurde aus saurer Lösung quantitativ ausgeäthert und wie früher beschrieben¹⁶ bestimmt. Die wäßrige Lösung wurde mit BaCO₃ bei 4° neutralisiert. Nach Zentrifugation wurde im Überstand Glukose mit dem Glukoseoxidasetest¹⁷ und Apiose nach Sandermann¹⁸ bestimmt.

Anerkennungen—Dr. H. Achenbach danken wir für die Aufnahme des Massenspektrums, Dr. K. Dumkow für eine Probe Iisorhamnetin und Prof. H. Grisebach sowie Dr. Sandermann Jr. für wertvolle Ratschläge. Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

¹⁵ H. GRISEBACH, *Helv. Chim. Acta* 51, 928 (1968); und dort angegebene Literatur A. MALHOTRA, V. V. S. MURTI und T. R. SESHADRI, *Tetrahedron* 23, 405 (1967).

¹⁶ W. BARZ und H. GRISEBACH, *Z. Naturforsch.* 21b, 47 (1966).

¹⁷ BERGMEYER und BERNT, in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Hersg. H. W. BERGMEYER), Verlag-Chemie, Weinheim (1962).

¹⁸ H. SANDERMANN, JR., *Phytochem.* 8, 1571 (1969).