

QUERCETIN-GALAKTOSID-GALLATE IN EUPHORBIACEEN

A.Nährstedt*, K.Dunkow, B.Janistyn, R.Pohl

Institut für Pharmazeutische Biologie der
Universität Freiburg i.Brsg.

(Received in Germany 13 December 1973; received in UK for publication 8 January 1974)

Aus zwei einheimischen Euphorbiaceen wurden mit den von uns üblicherweise angewendeten Isolierungsmethoden (z.B.1) zwei relativ polare Flavonoide V-3 (*E. verrucosa*) und P-4 (*E. platyphyllos*) rein dargestellt. Fp (V-3: 180-181°C, P-4: 202-204°C), IR-Spektrum sowie dc-Verhalten (SiO_2 - Toluol/EtOformiat/ $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ 4:4:1:1, V-3 $R_f=0.17$, P-4 $R_f=0.25$) zeigen deutlich, daß es sich um zwei verschiedene Substanzen handelt.

Saure Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (2) ergab sowohl für P-4 als auch V-3 Quercetin, Galaktose und Gallussäure als Komponenten, die dc, gc und nach Abtrennung UV- und IR-spektroskopisch identifiziert wurden. Alkalische Hydrolyse (3) in 0.5 $\text{M Na}_2\text{CO}_3$ lieferte Quercetingalaktosid und Spuren Gallussäure, die bei diesem pH degeneriert. β -Galaktosidase (Boehringer 15079 EGAY) setzte V-3 und P-4 nicht um. Hydrolyse mit Roh-Tannase (4) bei pH 6 ergab nach 2 1/2 h Gallussäure und Quercetingalaktosid, nach ca. 10 h auf Grund von Fremdaktivität zusätzlich freies Quercetin. Alkalische und enzymatische Hydrolyse weisen auf eine esterartige Verknüpfung der Gallussäure mit den Hydroxylgruppen des Quercetins und/oder der Galaktose hin.

Verschiebungsspektren in MeOH mit und ohne Komplexbildner (5) zwischen 420 und 220 nm zeigen bei leichten Intensitätsunterschieden weitgehende Identität. Die Auswertung der Spektren auf das Hydroxylierungsmuster am Quercetin ergibt freie Hydroxyle in Position 5, 7, 3' und 4' des Quercetins. Das 3-OH ist besetzt.

Aus diesen Befunden ist zu folgern, daß Quercetin in Position 3 glykosidisch mit Galaktose verknüpft und der Galloylrest am Zucker substituiert ist. Unterschiede zwischen P-4 und V-3 können demnach nur bestehen in unterschiedlicher molarer Zusammensetzung der Hydrolyseprodukte, der Konfiguration der

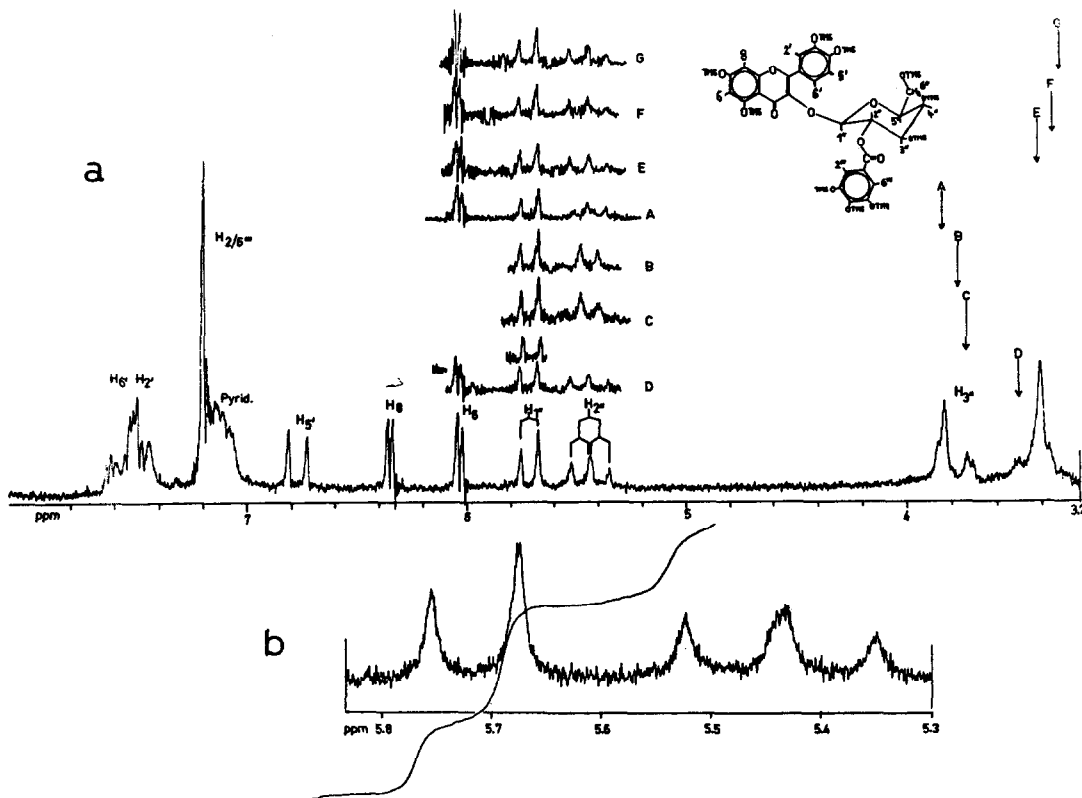


Abb. 1: 100-MHz-NMR von V-3 (Erklärung im Text)

glykosidischen Bindung oder der Stellung der Gallussäure am Zucker. Weiteren Aufschluß lieferte die NMR-Spektroskopie.

Das 100-MHz-NMR-Spektrum von trimethylsilyliertem V-3 (Abb. 1a) zeigt die charakteristischen Signale der Quercetinprotonen (5). Bei $\delta = 7.2$ ppm erscheint ein scharfes Singulett der äquivalenten Gallussäureprotonen. Zwischen 3.4 und 5.8 ppm treten die C-1- bis C-6-Protonen der Galaktose in Resonanz. Einstrahlung der Resonanzfrequenz bei A - G zeigt, daß das Signal bei $\delta = 5.7$ ppm dem H-1" zuzuordnen ist, da eine Entkopplung nicht stattfindet. Bei B und C wird das "Triplet" bei 5.44 ppm zu einem Duplett entkoppelt. Diese Ergebnisse deuten auf ein ABX-System zwischen den C-1-, C-2- und C-3-Protonen der Galaktose. Eine Berechnung der Intensitätsverteilung (6) des Dupletts des Signals von H-1" unter Annahme eines ABX-Spektrums ergibt einen Wert von 1 : 1.8. Durch Integration wird ein Wert von 1 : 1.75 ermittelt (Abb.1b) und damit das Vorliegen eines ABX-Spektrums

bewiesen. Daraus ergibt sich für die Lage der Galaktose-Protonen: H-1'': Duplett ($J_{1''2''}=8$ Hz) bei 5.72 ppm; H-2'': Quartett ($J_{2''1''}\sim 8$ Hz, $J_{2''3''}\sim 8$ Hz) bei 5.44 ppm; H-3'': $\sim 3.6 - 3.8$ ppm.

Folgende Aussagen sind dem NMR-Spektrum zu entnehmen: 1. Das molare Verhältnis der Hydrolyseprodukte in V-3 beträgt 1:1:1 (Integration von H-8, H-1'' und H-2''/6''). 2. Es liegt ein β -Galaktosid vor (ax/ax-Kopplung von 8 Hz des H-1'' mit H-2''). 3. Die große chemische Verschiebung des H-2'' um ca. 1.5 ppm gegenüber authentischem Quercetin-3- β -D-galaktopyranosid (Abb. 2c) ist bedingt durch die Benzoylsubstitution am C-2-OH der Galaktose; gleichzeitig erfährt das H-1'' eine paramagnetische Verschiebung um 0.2 ppm durch Anisotropieeffekte der in räumlicher Nähe stehenden Gallussäure. V-3 ist demnach ein Quercetin-3- β -D-galaktopyranosid-2''-gallat.

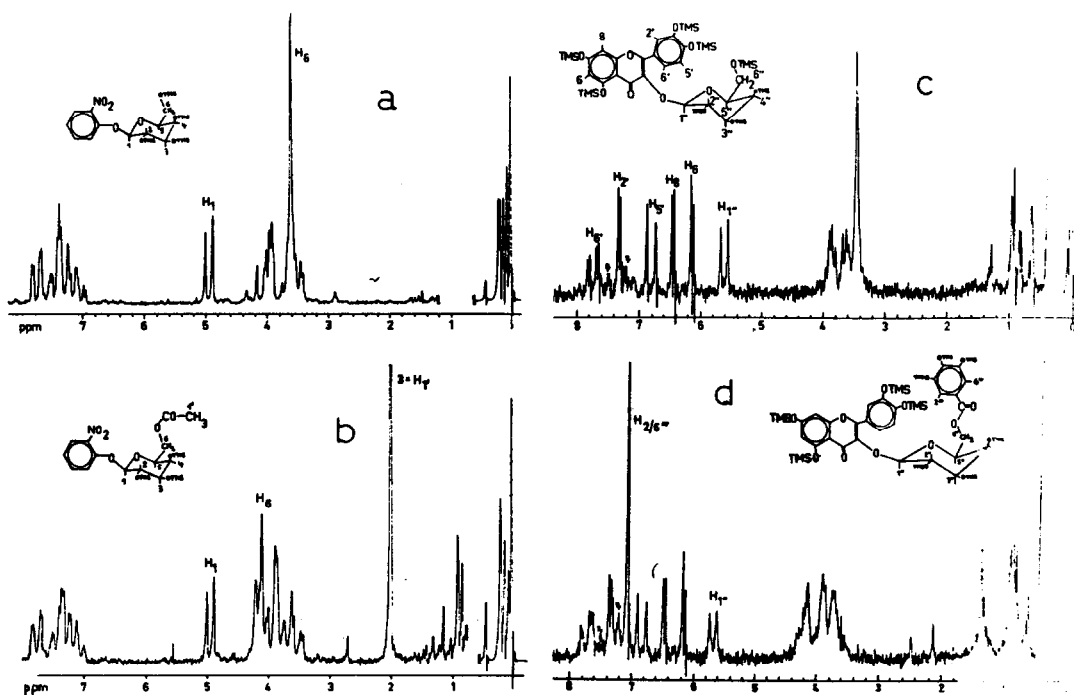


Abb. 2: a - d: 60-MHz-NMR von o-Nitrophenolgalaktosid (a), oNPG-Acetat (b), Quercetingalaktosid (c) und P-4 (d). Erklärung im Text.

Das 60-MHz-NMR-Spektrum von TMS-P-4 (Abb. 2d) unterscheidet sich von demjenigen des authentischen TMS-Quercetin-3- β -D-galaktopyranosids (Abb. 2c) durch das Auftreten eines scharfen Signals der beiden Gallussäureprotonen bei 7.1 ppm, dem Verschwinden eines Signals hoher Intensität bei 3.45 ppm sowie dem Auftreten eines neuen Signals bei 4.2 ppm im TMS-P-4. Sehr ähnliche Verhältnisse liegen beim Vergleich der Spektren von o-Nitrophenol- β -D-galaktopyranosid und o-Nitrophenol- β -D-galaktopyranosid-6'-acetat (7) durch chemische Verschiebung der C-6-Protonen der Galaktose vor (Abb. 2a + b). In Analogie hierzu schließen wir bei P-4 ebenfalls auf eine paramagnetische Verschiebung der C-6^aH₂ um etwa 0.75 ppm.

Daraus ergibt sich für P-4: 1. Das molare Verhältnis der Hydrolyseprodukte beträgt 1:1:1 (Integration von H-8, H-1^a, H-2^a/6^a). 2. Es liegt ebenfalls ein β -Galaktosid vor (Kopplungskonstante 8 Hz von H-1^a mit H-2^a). 3. Die chemische Verschiebung der H-6^a um 0.75 ppm ist mit einer Substitution des C-6-OH der Galaktose gut in Einklang zu bringen. P-4 ist demnach ein Quercetin-3- β -D-galaktopyranosid-6^a-gallat.

Danksagung: Herrn Dr.W.Hänsel (Pharm.Inst.) und Herrn Dr.H.H.Limbach (Phys.-chem.Inst.) danken wir für die Aufnahme und Diskussion der NMR-Spektren, Herrn Prof.Dr.J.Lehmann und Herrn E.Fuchs (Chem.Inst.) für die Überlassung der o-Nitrophenolgalaktoside, Frau G.Siudzinski und Herrn E.Thoma für wertvolle technische Hilfe.

Literatur:

- (1) DUMKOW, K.: *Planta medica* 19, 197 (1971)
- (2) KREUZALER, F. und K. HAHLBROCK: *Phytochemistry* 12, 1149 (1973)
- (3) BECK, A.B. und J.R. KNOX: *Aust.J.Chem.* 24, 1509 (1971)
- (4) ZIESE, W. in: *Handbuch der Pflanzenanalyse*, IV/2 p. 948, Springer-Verlag, Wien 1933
- (5) MABRY, T.J., K.R. MARKHAM und M.B. THOMAS: *The systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, New-York 1969
- (6) EMSLEY, J.W., J.FEENEY und L.H.SUTCLIFFE: *High Resolution NMR-Spectroscopy*, Pergamon Press, New-York 1967 Vol.I
- (7) FUCHS, E.F. und J. LEHMANN: *Chem. Ber.* (1974) im Druck