

MELAMPYROSID, EIN NEUES IRIDOID AUS *MELAMPYRUM SILVATICUM* L.

B. Z. AHN und P. PACHALY*

Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn 53 Bonn, Kreuzbergweg 26, BRD

(Received in Germany 6 March 1974; Received in the UK 7 July 1974)

Zusammenfassung—Aus *Melampyrum silvaticum* L. (Scrophulariaceae) wird neben Aucubin (1) das neue Iridoid Melampyrosid (2) isoliert und seine Struktur durch Spektren und chemische Reaktionen aufgeklärt.

Abstract—From *Melampyrum silvaticum* L. (Scrophulariaceae) the new Iridoid melampyrosid (2) was isolated beside aucubin (1). The structure of 2 is determined by spectral data and chemical reactions.

Die Gattung *Melampyrum* in der Familie Scrophulariaceae gilt als giftig und wird vom Vieh gemieden. Als Inhaltsstoff wurde bisher lediglich in einigen Spezies¹⁻³ das weitverbreitete Aucubin (1) beschrieben, während für *M. cristatum* festgestellt wurde, dass noch drei unbekannte Alkaloide enthalten sein sollen.⁴

Aus diesem Grunde schien es uns reizvoll, die Inhaltstoffe von *Melampyrum silvaticum* L. zu untersuchen. Die d.-c.-Untersuchung eines Methanol-Extraktes der ganzen frischen Pflanze (Fundort: Menzenschwand/Hochschwarzwald, Sammelzeit August 1973) ergab Hinweise auf zwei SbCl₅-positive Substanzen, von denen 1 sich im Dünnschicht-Chromatogramm wie authentisches Aucubin verhält, während 2 bei gleicher Färbung einen anderen Rf-Wert zeigt und sich im Gegensatz zu 1 aus einer wässrigen Lösung in Essigsäureäthylester ausschütteln lässt. Über Isolierung und Strukturaufklärung dieser beiden Inhaltstoffe 1 und 2 soll hier berichtet werden.

Zur Isolierung von 1 und 2 wurde der Rückstand des Methanol-Extraktes in Wasser suspendiert. Nach zweitägigem Stehenlassen wurde das Filtrat mit Essigsäureäthylester gründlich ausgeschüttelt, wobei 1 in der wässrigen Phase verblieb, während 2 vollständig in die Essigester-Phase überging. Aus der wässrigen Phase liess sich nach säulenchromatographischer Abtrennung von höhermolekularen Verbindungen wie Gerbstoffen, Flavonoiden etc. über Polyamid durch Gelchromatographie an Sephadex G 25 ca. 0.2% (bezogen auf die frische Pflanze) reines 1 isolieren. Der Schmelzpunkt (183°), d.c.-Verhalten und spezifische Drehung ($[\alpha]_D^{25} = 170.9^\circ$) erwiesen sich als identisch mit authentischem Aucubin. Erwartungsgemäss zeigte auch das Acetylierungsprodukt 1a mit einem Schmelzpunkt von 128°

und einer spezifischen Drehung von $[\alpha]_D = 154^\circ$ keine Abweichungen zu den Angaben für Acetylaucubin.⁵ Bei der Hydrierung mit Pd-Aktivkohle als Katalysator nahm 1a 2.8 Äquivalente H₂ (theoretisch: 2.0) auf. Das über Kieselgel gereinigte Hydrierungsprodukt 1b zeigte die erwarteten Eigenschaften. Hiermit ist also bewiesen, dass 1 identisch mit Aucubin ist.

Das Melampyrosid (2) aus der Essigesterphase wurde nach säulenchromatographischer Reinigung über Polyamid und anschliessend über Kieselgel als farblose Substanz gewonnen.

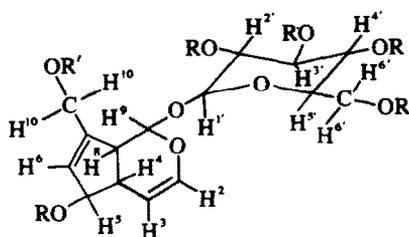
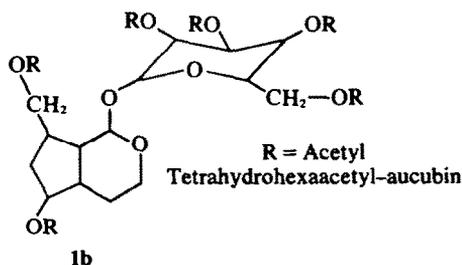
Im UV-Spektrum zeigte 2 die drei benzoltypischen Maxima bei 197, 232 und 274 nm, die mit denen des Benzoesäure-äthylesters genau übereinstimmen.

Vorsichtige Hydrolyse von 2 mit 0.05 n NaOH ergab neben unverändertem Melampyrosid (2) als Spaltprodukte Aucubin (1) und Benzoesäure (Schmp. 121–22°).

Hieraus ging eindeutig hervor, dass Melampyrosid (2) ein Benzoylaucubin sein musste, dessen Struktur im folgenden aufgeklärt wird.

Durch saure Hydrolyse von 2 liess sich erwartungsgemäss der Zuckerteil abspalten, der sich nach Isolierung über Sephadex G 25 dünnenschichtchromatographisch als Glukose erwies und dessen NMR-Spektrum nach Acetylierung identisch mit dem der Acetylglukose ist. Zur Aufnahme des Massenspektrums wurde das Trimethylsilylierungsprodukt (2b) eingesetzt. Obwohl im Massenspektrum der Molekülpeak von 2b (m/e 810) nicht sichtbar ist, lässt er sich aus den Schlüsselbruchstücken m/e 451 und m/e 359 rekonstruieren.

Durch die zuckertypische Spaltung (Zerfall a) wird einerseits ein Fragment m/e 451 gebildet, das dann unter sukzessiver Eliminierung von



- 1: R = R' = H Aucubin
1a: R = R' = Acetyl Hexaacetylaucubin

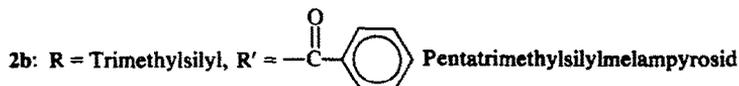
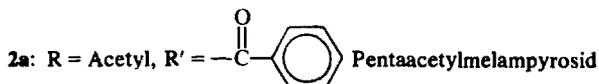
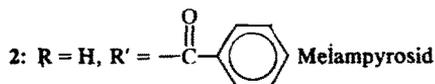


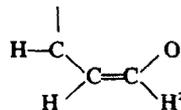
Abb. 1.

Trimethylsilanol (MZ 90) in die Bruchstücke m/e 361 bzw. m/e 271 übergeht. Durch den Zerfall b entsteht andererseits das relativ stabile Fragment m/e 343, das dem Aglykon von 2 entspricht. Es zerfällt weiter in die Bruchstücke m/e 253 und m/e 148.

Durch die Fragment m/e 105 und 77 wird die Benzoessäureestergruppe in 2 bewiesen. Die Abwesenheit eines Benzoessäure-Peaks (m/e 122) macht zusätzlich wahrscheinlich, dass die Esterbindung in 2 nicht über eine ringständige OH-Gruppe (C_3) erfolgt, sondern an der primären Gruppe am C_{10} in der Seitenkette vorliegt. Im anderen Fall sollte durch die energetisch begünstigte McLafferty-Umlagerung der Benzoessäure-Peak bei m/e 122 auftreten. Diese Aussagen des Massenspektrums werden durch die Kernresonanzspektren bestätigt: Das Spektrum von 2 lässt die Signale für die fünf aromatischen Protonen (bei $\tau = 1.82$ – 1.97 bzw. 2.33 – 2.53) im Verhältnis 2:3 erkennen.

Da das einem Proton entsprechende Quadruplett bei $\tau = 3.67$ eine typische "ronge-range"-Kopplung eines mit einem elektronegativen Substituenten

benachbarten Allylsystem zeigt, enthält das Molekül die Teilstruktur dieses Quadruplett entspricht also dem H^2 des Iridoidgerüsts. Bei $\tau = 5.29$ erscheint das Dublett von H^1 , dessen



Zuordnung durch Entkopplung bewiesen wird. Aus der Kopplungskonstanten von 7 Hz ergibt sich, dass die Glukose β -glykosidisch gebunden ist.⁷

Bei $\tau = 6.28$ liegt das Signal der beiden Methylenprotonen H^6 . Das zum Vergleich eingesetzte Glukosespektrum⁸ (trimethylsilyliert) zeigt dieses Signal ebenso wie das Multiplett zwischen $\tau = 6.42$ und $\tau = 6.80$, das also den Glukoseprotonen H^2 , H^3 , H^4 und H^5 entspricht. Im NMR-Spektrum von 2a erscheinen bei $\tau = 7.80$ – 8.20 erwartungsgemäß die Signale von 5 O-Acetylgruppen, die den 5 OH-Gruppen von 2 entsprechen.

Im Spektrum von 1a erkennt man bei $\tau = 7.20$ ein

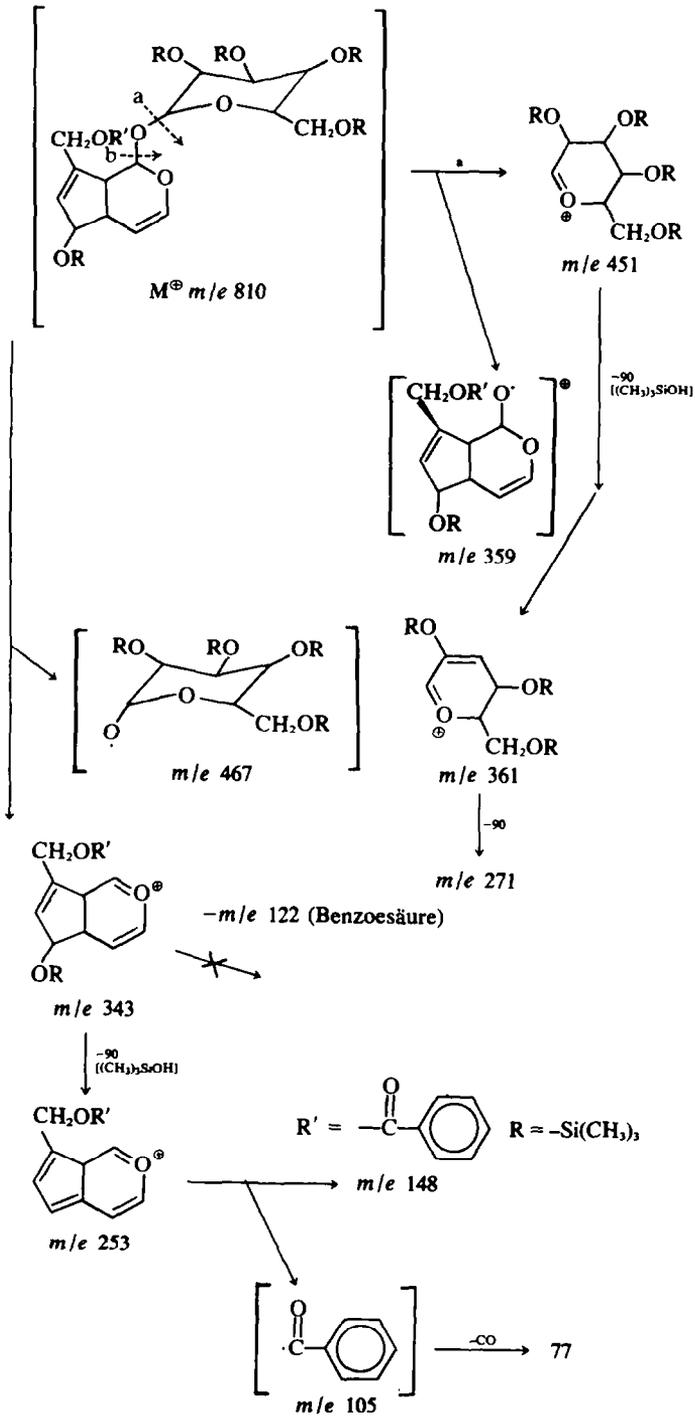


Abb. 2. Massenspektrometrische Fragmentierung des Pentatrimethylsilylmelampyrosids.

Multiplett, das durch Entkopplung das allyliche Quadruplett von H^2 ($\tau = 3.87$) in ein Dublett übergehen lässt. Dieses Multiplett, das an fast gleicher Stelle im Spektrum von **2a** erscheint, entspricht also dem Proton H^3 .

Das ebenfalls einem Proton entsprechende Triplet bei $\tau = 4.20$ zeigt eine zweite allyliche Doppelbindung in **1a**, es fehlt erwartungsgemäss im NMR-Spektrum des Tetrahydrohexaacetyl-aucubins **1b**.

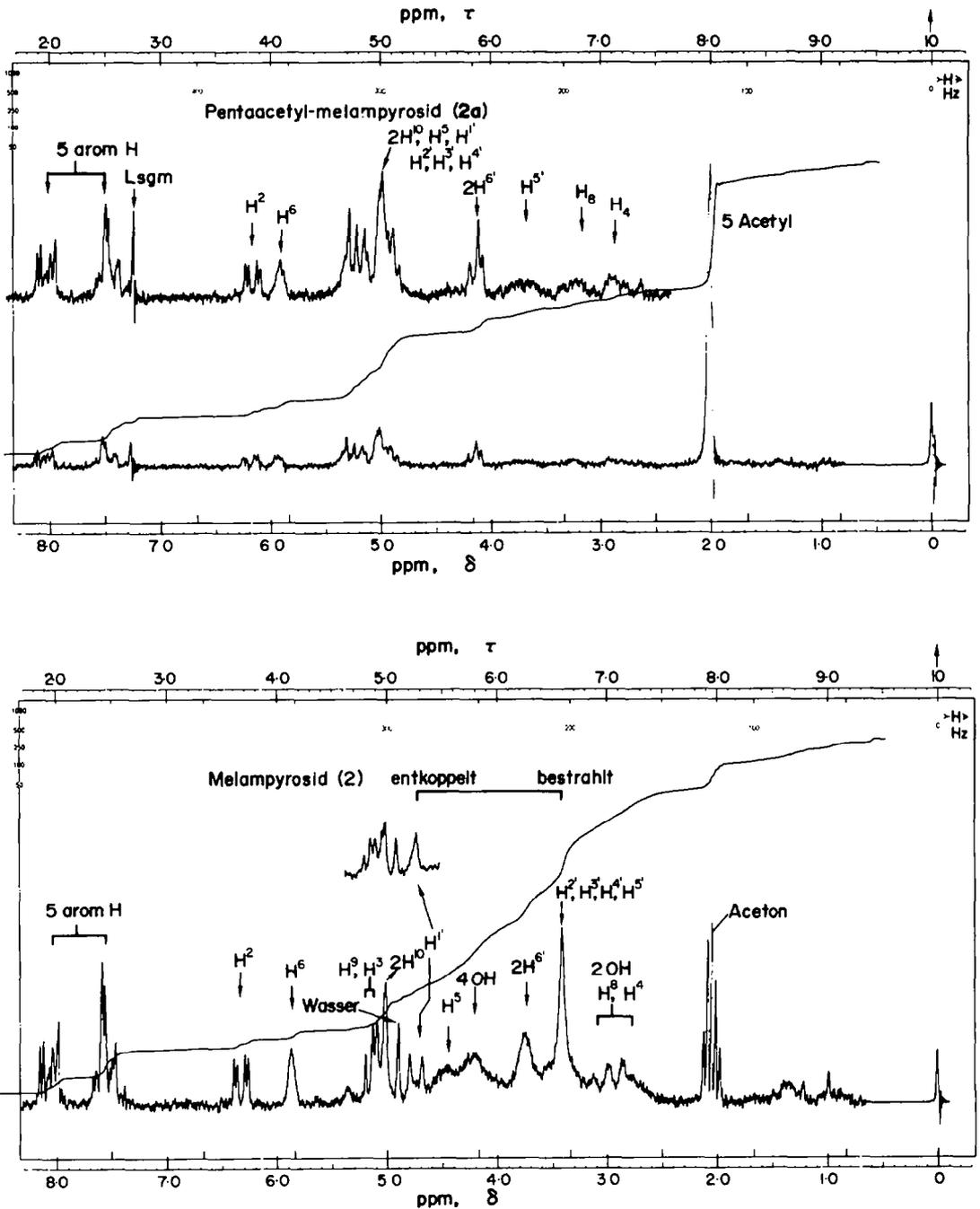
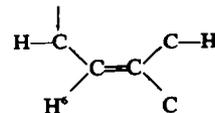


Abb. 3. NMR-Spektren von 2 in CD₂=CO-CD₃; 2a in CDCl₃.

Die Kopplungskonstante 2,00 Hz dieses Triplets zeigt aber, dass dieses Proton kein Nachbarproton an einer Doppelbindung besitzt. Es liegt also die Teilstruktur vor; das Triplett entspricht dem Proton H⁶.



Im NMR-Spektrum von **2** erscheint das Signal der Methylenprotonen H^{10} bei tieferem Feld ($\tau = 5.00$) als das der Methylenprotonen H^6 des Glukoseteils. Diese Tatsache spricht dafür, dass die Methylenprotonen H^{10} neben dem Sauerstoff noch durch die anisotrope Doppelbindung zwischen C_6 und C_7 beeinflusst werden. Eine zusätzliche, weitere Verschiebung nach tieferem Feld erfahren die H^{10} -Protonen durch die benachbarte Benzoylgruppe. Durch Acetylierung von **2** erscheint dieses Signal im NMR-Spektrum von **2a** nur geringfügig nach tieferem Feld verschoben ($\tau = 4.97$), während das entsprechende Signal der H^6 -Protonen des Glukoseteils dadurch von $\tau = 6.28$ nach $\tau = 5.90$ verschoben wird. Im NMR-Spektrum von **1a** (anstatt der Benzoylgruppe eine Acetylgruppe an C_{10}) dagegen erscheint das H^{10} -Protonensignal deutlich nach höherem Feld verschoben bei $\tau = 5.32$.

Die Acetylgruppe zeigt hier also einen geringeren paramagnetischen Effekt als die Benzoylgruppe. Hierdurch wird ebenfalls bewiesen, dass sich die Benzoessäureestergruppe an C_{10} befindet. Das NMR-Spektrum von **1a** ähnelt im übrigen sehr dem des Hexaacetyl-leonurids, eines Iridoids, über das Weinges und Mitarb.⁹ kürzlich berichteten. Die vorliegenden Untersuchungen beweisen, dass das Melampyrosid (**2**) ein 10-Benzoylaucubin ist. Derartige Benzoessäureester von Iridoiden¹² sind unseres Wissens nicht beschrieben worden, wohl aber Ester mit *p*-Hydroxybenzoessäure¹⁰, Zimtsäure¹¹ oder Vanillinsäure.⁹

VERSUCHSTEIL

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Schmelzpunktmikroskop nach Opfer-Schaum beobachtet und sind nicht korrigiert. Die IR-Spektren wurden mit dem Gerät IR-33 von Beckman, die NMR-Spektren mit Varian 60 A-Gerät, das Massenspektrum mit MS 9 und die optischen Drehungen mit Perkin-Elmer 141 aufgenommen.

(1) Extraktion der Droge.

6.5 kg der frischen Droge wurden in 12 l Methanol zerkleinert und gepresst. Nach dem Verdampfen des Methanols wurde die klebrige Masse mit 3 l Wasser versetzt, geschüttelt und 48 Stunden stehengelassen. Die dabei entstandenen Niederschläge, meist Chlorophylle, wurden abzentrifugiert, die Niederschläge nochmals mit 2 l Wasser versetzt, geschüttelt und stehengelassen. Nach Abzentrifugieren wurden die Überstände vereint. Die wässrige Lösung wurde mit 40 l Essigester ausgeschüttelt, wobei eine Wasserphase (W 1 ca. 4.5 l) und eine Essigesterphase gewonnen wurden. Die Essigesterphase wurde bis auf 1 l eingengt, mit 1 l Wasser versetzt, anschliessend wurde der Essigester völlig verdampft. Nach 24 Stunden Stehenlassen wurden die Niederschläge abfiltriert (Filtrat A), in 1 l Essigester gelöst, mit 1 l Wasser versetzt, der Essigester erneut völlig verdampft und der Niederschlag nach 24 Stunden abfiltriert (Filtrat B). Beide Filtrate (A + B) wurden vereinigt (ca. 1.4 l W 2) und durch Ausschütteln mit Chloroform von den fettartigen Stoffen befreit.

(2) Isolierung von Aucubin (1)

300 ml von W 1 wurden zur Trockne gebracht und das Trockenprodukt mit 500 ml Aceton versetzt und unter häufigem Schütteln 24 Std. stehengelassen. Der acetonunlösliche Teil wurde in 200 ml Wasser gelöst. 50 ml dieser wässrigen Lösung wurden über eine Polyamidsäule (80 × 2.5 cm) aufgetragen und mit Wasser eluiert. Nach dem Abdampfen des Wassers von der $SbCl_5$ -positiven Fraktion ($Ve = 150$ ml) verblieb eine braune Masse. Diese wurde in 20 ml Wasser gelöst, auf eine Sephadex G 25-Säule (80 × 2.5 cm) aufgetragen und mit Wasser eluiert, wobei alle gelbe, $SbCl_5$ -positive Fraktion ($Ve = 80$ ml) 1 gewonnen wurde. Farblose Kristalle (85% Äthanol), Schmp. 183°, Ausbeute: 610 mg (ca. 11 g bezogen auf 6.5 kg frische Droge). $[\alpha]_D^{25} = 170.9^\circ$ ($c = 0.1$, Wasser); $C_{15}H_{22}O_8$ (346.341) Ber. C, 52.20; H, 6.40; Gef. C, 51.98; H, 6.51. Rf-Wert = 0.35 (Cellulosefertiplatte Riedel de Haen), Laufmittelsystem: Wasser/n-Butanol/Eisessig 5:4:1, Detektionsmittel = 5% $SbCl_5$ in $CHCl_3$.

1.86 mg von **1** wurden in Pyridin (8 ml) mit Acetanhydrid (10 ml) acetyliert. Das acetylierte Produkt wurde über eine Kieselgelsäule (80 × 2.5 cm) mit Benzol/Aceton (9:5:0.5) gereinigt. Der Rf-Wert ist mit dem von Acetylaucubin identisch (Rf-Wert = 0.53, Kieselgelfertiplatte Riedel de Haen), Laufmittel Benzol:Aceton 9:1, Detektionsmittel 5% $SbCl_5$ in $CHCl_3$. Nach drei Umlösungen in Methanol/Wasser (5:5) wurden ca. 150 mg farblose Kristalle **1a** erhalten. Schmp.: 128°; $[\alpha]_D^{25} = -154^\circ$ ($c = 0.1$, Aceton). NMR ($CDCl_3$, τ , TMS): 3.87 (H^2 , Quadruplett [$J_{H^2,H^4} = 6.5$, $J_{H^2,H^6} = 1.5$]), 4.20 (H^6 , Triplett), 4.75–5.20 (H^{10} , H^8 , H^7 , H^9 , H^5 und H^4 , Multipllett), 5.32 (2 H^{10} , Singulett), 5.83 (2 H^6 , Triplett), 6.30 ($H^{3'}$, Multipllett), 6.82 (H^3 , Multipllett) 7.20 (H^1 , Multipllett, 7.97–8.04 (18 Acetylprotonen). $C_{27}H_{38}O_{15}$ (598.569) Ber. C, 54.16; H, 5.72; Acetyl 42.82; Gef. C, 53.93; H, 5.65; Acetyl 43.03.

(3) Isolierung von Melampyrosid (2)

200 ml von W 2 wurden bis auf 50 ml eingengt, auf eine Polyamidsäule (80 × 2.5 cm) aufgetragen und mit Wasser eluiert. Die gelbliche $SbCl_5$ -positive Fraktion ($Ve = 210$ ml) wurde zur Trockne eingedampft, in 50 ml Chloroform/Methanol (9:1) gelöst und erneut auf eine Kieselgelsäule (50 × 2.5 cm) aufgetragen und mit Chloroform/Methanol (5:1) eluiert. Das bei $Ve = 140$ ml erhaltene Melampyrosid (**2**) wurde in Essigester dreimal umgelöst 520 mg, ca. 5.2 g bezogen auf 6.5 kg frischer Droge). Farblos, amorph, Schmp.: 84–85°; $[\alpha]_D^{25} = -50^\circ$ ($c = 0.3$, Aceton). $C_{22}H_{26}O_{10}$ (450.450) Ber. C, 58.66; H, 5.81; Gef. C, 58.19; H, 6.01. Rf-Wert = 0.81, Cellulosefertiplatte Riedel de Haen, Wasser/n-Butanol/Eisessig (5:4:1).

Zur Aufnahme des NMR-Spektrums wurden 100 mg Melampyrosid (**2**) wie oben acetyliert. Das Acetylierungsprodukt (**2a**) wurde dreimal in Wasser/Methanol (5:5) umgelöst und ergab 85 mg farblose Kristalle, Schmp. 74–75°; $[\alpha]_D^{25} = -94^\circ$ ($c = 0.33$ Aceton). Rf-Wert 0.62 Kieselgelfertiplatte Benzol/Aceton (7:3) $C_{32}H_{38}O_{15}$ (660.880) Ber. C, 58.22; H, 5.48; Gef. C, 58.18; H, 5.54.

(4) Alkali-Hydrolyse des Melampyrosids (2)

500 mg Melampyrosid (**2**) wurden in 20 ml 0.05 n-NaOH gelöst und bei 30° 24 Std. stehengelassen. Das Hydrolysat wurde über eine Sephadex G 25-Säule (80 × 2.5 cm) mit Wasser chromatographiert.

1. Fraktion ($Ve = 55$ ml)—vor und nach der

Acetylierung zeigt sie gleiche Rf-Werte wie das W 1 (Aucubin); 2. Fraktion ($V_e = 48$ ml)—unverändertes Melampyrosid (2); 3. Fraktion ($V_e = 70$ ml)—Benzoesäure, im Wasser umkristallisiert; Schmp.: 121–122°.

(5) *HCl-Hydrolyse des Melampyrosids (2)*

100 mg Melampyrosid (2) wurden in 25 ml 0.5 n-HCl gelöst und bei 40° 20 Std. hydrolysiert. Der Zuckerteil wurde über Sephadex G 25 von anderen Produkten getrennt und anschliessend analog 2) peracetyliert. Nach NMR-Spektrum (als Pentaacetylprodukt) und Rf-Wert 0.15 ist es Glukose (Wasser/n-Butanol/Eisessig 5:4:1, Detektionsmittel 1:2 g *p*-Anisidin +1.6 g Phthalsäure in 50 ml Äthanol).

(6) *Hydrierung von 1a zu 1b*

200 mg (0.344 mmol) von 1a wurden in 30 ml Methanol mit Pd-Aktivkohle bei 26° hydriert. Nach 10 Min. verlief die Hydrierung zu Ende. H_2 -Verbrauch: 21 ml (0.94 mmol), theoretisch 0.67 mmol (15 ml). Der Katalysator wurde abfiltriert und mit Chloroform (100 ml) dreimal nachgewaschen. Nach Verdampfen der vereinten Filtrate wurde das Reaktionsprodukt in Pyridin mit Acetanhydrid erneut acetyliert. Das acetylierte Hydrierungsprodukt (1b) wurde über eine Kieselgelsäule (40×1.0 cm) mit Chloroform/Methanol 9:1 gereinigt ($V_e = 36$ ml) und danach aus Äthanol zweimal umkristallisiert (57 mg). Farblose Kristalle. Schmp.: 154–155°. NMR ($CDCl_3$, τ , TMS): 4.73–5.25 (H^1 , H^2 , H^3 , H^4 , $2H^{10}$, H^9 , Multiplett), 5.83 ($2H^6$, H^7 , Multiplett), 6.42 (H^5 , $2H^2$, Multiplett), 7.97–8.02 (18-Acetylprotonen), 8.34–9.05 ($2H^3$, $2H^4$, H^8 , H^7 , Multiplett). $C_{27}H_{38}O_{13}$ (602.601) Ber. C, 53.81; H, 6.35; Gef. C, 54.02; H, 6.31.

(7) *Trimethylsilylierung von 2 zur Aufnahme des Massenspektrums*

1 mg Melampyrosid (2) wurden in 10 ml Pyridin aufgenommen, die Lösung mit 1 ml Hexamethyldisilazan und 1 ml Trimethylchlorosilan tropfenweise nacheinander versetzt und unter öfterem Umrühren 30 mMin. bei Raumtemperatur stehengelassen. Hierauf wurden das Lösungsmittel und die restlichen Reagenzien abdestilliert. Der Rückstand (2b) wurde mit CCl_4 (20 ml) suspendiert und filtriert. Nachdem das Lösungsmittel dem Filtrat entzogen

wurde, hinterblieb ein schwach gelbliches Öl. Mol.-Gew. 810.

m/e (Intensität): 468 (8.6), 467 (11.8), 452 (7.1), 451 (5.0), 433 (5.7), 380 (7.5), 361 (100), 360 (14.3), 359 (5.7), 343 (21.4), 342 (7.3), 331 (14.0), 319 (17.9) 310 (21.4), 289 (36), 281 (10.7), 271 (23), 253 (57), 243 (10.7), 221 (23.5), 217 (36), 204 (14.3), 191 (14.8), 169 (10.7), 149 (17.7), 148 (34.2), 147 (23), 129 (21.4), 105 (50), 103 (31), 77 (19.3).

Wir danken Herrn Dr. G. Eckhardt (Organisch-chemisches Institut der Universität Bonn) für die Aufnahme des Massenspektrums, dem Fonds der Chemischen Industrie für Sachbeihilfen.

LITERATUR

- ¹M. Bridel und M. Braecke, *C. R. hebdomadaire Seances Acad. Sci.* **173**, 414 (1921)
- ²M. Braecke, *Bull. soc. chim. biol.* **4**, 407 (1922); *C. R. hebdomadaire Seances Acad. Sci.* **175**, 990 (1920)
- ³B. Broda, L. Swiatek und J. Druzynski, *Acta Pol. Pharm.* **26**, 255 (1969). (*C. A.* **72**, 75604 v)(u. 15700 p)
- ⁴S. G. Karimova, *Rast Resur*, **5**, 416 (russ.) (1969); (*C. A.* **72**, 15700p)
- ⁵P. Karrer und H. Schmidt, *Helv. Chim. Acta* **29**, 525 (1946)
- ⁶H. Obara und A. Fujino, *Chem. and Ind.* **955** (1959)
- ⁷J. M. v. d. Veen, *J. Org. Chemistry* **28**, 564 (1963)
- ⁸T. J. Mabry, J. Kagan and H. Rösler, *Phytochemistry* **4**, 177 (1965)
- ⁹K. Weinges, P. Kloss und W.-D. Henkels, *Liebigs Ann. Chem.* **759**, 173 (1972); *Ibid* **556**, (1973)
- ¹⁰J. M. Bobitt, H. Schmidt und T. B. Africa, *J. Org. Chemistry* **26**, 3090 (1961)
- ¹¹H. Lichti und A. von Wartburg, *Tetrahedron Letters* **853** (1964)
- ¹²Anmerkung bei der Korrektur (10.9.74): Inzwischen haben wir erfahren, dass L. H. Fikeuscher, R. Hegnauer und H. W. L. Ruijgrok (*Pharm. Weekblad* **104**, 561 (1969)) ein nicht näher gekennzeichnetes Benzoyl-aucubin als Rhinanthglabin aus *Rhinanthus glaber* Lamk. isoliert haben.