

Flavonoide von *Larrea tridentata*\*

Flavonoids of *Larrea tridentata*

JEAN JACQUES CHIRIKDJIAN

Forschungslaboratorien der Laevosan-Ges., Linz/D.

(Z. Naturforsch. 28 c, 32—35 [1973]; eingegangen am 9. Oktober 1972)

Flavonoids, *Larrea tridentata*

The presence of 20 flavonoids has been detected in herbs of *Larrea tridentata*. Six pigments were isolated and characterized by chromatographic and spectrophotometric methods (shifts with several reagents), acid hydrolytic and alkaline cleavage and finally by comparison with authentic samples.

The structure of this compounds has been established as: quercetin-3-rhamnoglucoside, quercetin-3-glucoside, kaempferol-3-methyl ether, quercetin-3'-methyl ether, kaempferol and quercetin.

*Larrea tridentata* (MOQ. & SES. ex DC.) COVILLE (= *Neoschroetara tridentata* (MOQ. & SES. ex DC.) BRIQ. = *Larrea mexicana* MORIC.) Fam. Zygophyllaceae ist in trockenen Gebieten der südlichen USA und Mexiko beheimatet. Dieser immergrüne Strauch trägt zahlreiche dünne Zweige, die Blätter sind klein, lanzettlich bis sichelförmig, lederartig und harzreich.

Da über die Flavonoidführung in *Larrea tridentata* bisher noch nichts bekannt ist, soll im folgenden über die isolierten und identifizierten Flavonoidglycoside und Aglykone berichtet werden. Unsere Untersuchungen erstrecken sich auf das Kraut – hauptsächlich Blätter und Zweige –, welches in Mexiko in früheren Jahren geerntet wurde. Die Droge ist dort als *Herba Palo-ondo* bekannt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Anreicherungen der Flavonoide aus Drogenmaterial wurden nach üblichen Methoden vorgenommen (s. exp. Teil).

Durch zweidimensionale DC mit verschiedenen Sorptionsmaterialien und Laufmitteln gelang es uns, in *Larrea tridentata* insgesamt 20 Flavonoide (5 in Spuren) nachzuweisen. Als Charakteristikum dienten Farbe und Fluoreszenz vor und nach Besprühen entweder mit AlCl<sub>3</sub> oder Flavognostlösung (Diphenylborsäure-2-aminoäthylester). So wurden im Fließmittel 1.1. 20, 1.2. 14 und 2.1. 16 Flavonoide festgestellt, von denen mindestens 4 mit Sicherheit als Glykoside angesprochen werden können.

Tab. 1. *bR<sub>f</sub>*-Werte in verschiedenen Fließmitteln sowie Fluoreszenz einiger Verbindungen aus *Larrea tridentata*.

	Chromatographiesysteme						Eigenfluoreszenz +AlCl <sub>3</sub> +Flavognost		
	1.1.	1.2.	2.1.	5.2.	6.1.	6.2.			
Quercetin-3-rhamnoglucosid (1)	0/63	48/47	43/17	33	2	3	dklbr.	g	o
Quercetin-3-glucosid (2)	0/52	34/58	30/27	56	4	5	dklbr.	g	o
Kämpferol-3-methyläther (3)	65/36	—	0/47	98	42	46	dklbr.	gg	gn
Quercetin-3'-methyläther (4)	51/6	0/75	0/38	98	32	34	g	gg	gn
Kämpferol (5)	26/8	0/85	0/29	98	26	27	g	gg	gn
Quercetin (6)	8/5	0/66	0/16	98	12	15	g	gg	o

Dklbr. = dunkelbraun; g = gelb; gg = gelbgrün; gn = grün; o = orange.

\* Herrn Prof. Dr. K. JENTZSCH zum 60. Geburtstag gewidmet.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Mag. pharm. J. J. CHIRIKDJIAN, Laevosan-Gesellschaft, A-4020 Linz/D., Estermannstraße 17.



Tab. II. UV-Absorptionsmaxima von einigen Flavonol-Glykosiden und Aglykonen aus *Larrea tridentata*.

	$\lambda$ max (nm) in Äthanol			$\Delta \lambda$ (nm)			
	Band I		Band II	+AlCl <sub>3</sub> Band I	+NaOAc Band II	+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> Band I	+NaOH Band I
Quercetin-3-rhamnoglucosid	361 (295)	(269)	259	44	14	24	55
Quercetin-3-glucosid ( <b>2</b> )	362 (295)	(269)	258	43	16	17	52
Kämpferol-3-methyläther( <b>3</b> )	352 (300)		267	47	7	0	52
Quercetin-3'-methyläther ( <b>4</b> )	370 (290)	(270)	253	57	19**	2	60**
Kämpferol ( <b>5</b> )	367 (295)		268 (254)	59	8	1	64***
Quercetin( <b>6</b> )	372 (290)	(268)	257	59	19**	16	—*

( ) = Schulter, Ac = Acetyl, \* sofortige —, \*\* rasche —, \*\*\* langsame Zersetzung.

Die Isolierung der Flavonoidglykoside erfolgte vorerst über eine Cellulosesäule mit dem Elutionsmittel Wasser, wobei die ersten zwei erhaltenen Verbindungen **1** und **2** durch weiteres Chromatographieren über eine Polyamidsäule (Methanol-Wasser) rein gewonnen wurden. Die Aglykone trennten wir über eine Polyamidsäule (Chloroform-Methanol-Äthylmethylketon) und reinigten durch präparative PC. Die ersten Eluate sind noch in Untersuchung, die letzten vier Verbindungen **3**, **4**, **5** und **6** wurden der Reihe nach eluiert.

Die Identifizierung der einzelnen Verbindungen erfolgte durch die Wandereigenschaften auf DC und PC mit verschiedenen Fließmitteln, Farbe und Fluoreszenz (Tab. I), UV-Absorption, Verschiebung der Absorptionsmaxima nach Reagenzienzusatz (Tab. II), Säurehydrolyse und Nachweis von Zuckerkomponenten, Alkalihydrolyse und Identifizierung der Spaltprodukte. Der Identitätsnachweis von einigen dieser Flavonoide konnte zusätzlich durch vergleichende Untersuchungen (UV-Spektren und Cochromatographie) mit authentischem Material erhärtet werden.

#### Verbindung 1

Die Lage am Chromatogramm mit dem Fließmittel 2.1. war für ein Flavonoid-Diglykosid charakteristisch<sup>1,2</sup>. Die UV-Daten und Verschiebungen ließen auf Flavonol — das an den C-Atomen 5.7.3.<sup>1</sup> und 4<sup>1</sup> freie Hydroxylgruppen trägt, während das OH an C-3 veräthert sein dürfte — schließen<sup>3-8</sup>.

Die Hydrolyse mit 2 N HCl lieferte Glucose und Rhamnose. Das Aglykon war mit Quercetin (**4**) identisch. Der Alkaliabbau mit 10-proz. KOH nach<sup>9</sup> ergab Phloroglucin und Protocatechusäure. Durch direkten Vergleich mit Rutin (UV-Spektren und Cochromatographie) konnte **1** als Quercetin-3-rhamnoglucosid identifiziert werden.

#### Verbindung 2

Diese Substanz war am Chromatogramm, Schichtpolyamid bzw. Cellulose, als dunkler Fleck zu erkennen. Die  $R_f$ -Werte im Fließmittel 2.1. sprachen für ein Monoglycosid<sup>1,2</sup>. Die UV-Daten ergaben ähnliche Ergebnisse wie bei **1**. Nach der Säurehydrolyse wurden als Zucker Glucose, als Aglykon Quercetin (**4**) nachgewiesen. Die Alkalihydrolyse ergab als Abbauprodukte Phloroglucin und Protocatechusäure. UV-Spektren und chromatographisches Verhalten stimmten mit Isoquercitrin überein. Somit handelt es sich bei **2** um Quercetin-3-glucosid.

#### Verbindung 3

Im Chromatogramm auf Polyamid erschien dieses Flavonoid als dunkler (absorbierender) Fleck; es verhielt sich wie ein Aglykon, der  $R_f$ -Wert lag im Fließmittel 6.1. und 6.2. zwischen Quercetin-3'-methyläther und Kämpferol-4'-methyläther. Der negative Ausfall der Säurehydrolyse bestätigte, daß es sich um ein Aglykon handelte. Das UV-Maximum in Äthanol 352 nm sprach für einen Flavonol-3-methyläther<sup>3</sup>. Die freien Hydroxyle an C-5, C-7 und C-4<sup>1</sup> wurden durch die bathochrome Verschiebung mit AlCl<sub>3</sub>, NaOAc, und NaOH gesichert<sup>4-6,8</sup>. Als Abbauprodukte wurden nach der Alkalihydrolyse Phloroglucin und *p*-Hydroxybenzoesäure nachgewiesen. Die Meßdaten von **3** decken sich gut mit den Angaben für Isokämpferid (Trivialname nach<sup>10</sup>). Nach diesen Ergebnissen kann **3** als Kämpferol-3-methyläther angesprochen werden.

#### Verbindung 4

Die Laufeigenschaft in mehreren Fließmitteln deutete auf ein Aglykon hin (Säurehydrolyse negativ). Die

Meßdaten brachten die Bestätigung, daß es sich um Flavonol handelt, mit freien Hydroxylgruppen an C-7 und C-4' <sup>4-8</sup>. Als Abbaukomponenten der Alkalihydrolyse wurden Phloroglucin und Vanillinsäure identifiziert. Die UV-Spektren und das chromatographische Verhalten stimmten mit dem aus *Polygonum acre* isolierten Isorhamnetin überein <sup>11</sup>. Somit ist **4** Quercetin-3'-methyläther.

### Verbindung 5

Auch bei diesem Flavonoid handelt es sich um ein Flavonolaglykon. Die langsame Zersetzung durch Zusatz von NaOH und die bathochrome Verschiebung von Band II nach Zusatz von NaOAc weisen auf freie Hydroxylgruppen an C-3, C-4' und C-7 hin <sup>3, 6, 8</sup>. Phloroglucin und *p*-Hydroxybenzoesäure konnten als Abbauprodukte der Alkalihydrolyse nachgewiesen werden. Durch direkten Vergleich mit 3.5.7.4'-Tetrahydroxyflavon konnte **5** als Kämpferol identifiziert werden.

### Verbindung 6

**6** verhielt sich ebenfalls wie ein Flavonolaglykon (Säurehydrolyse negativ). Die UV-Daten ließen freie Hydroxylgruppen an C-3', C-7, C-3' und C-4' erkennen <sup>3-8</sup>. Die Alkalihydrolyse lieferte Phloroglycin und Protocatechusäure. Es ergab mit authentischem 3.5.7.3'.4'-Pentahydroxyflavon Übereinstimmung (UV-Spektren und Cochromatographie), somit ist **6** Quercetin.

## Experimentelles

### Extrakterstellung

500 g gepulverte Droge wurden in eine Soxhlet-apparatur mit Wasser 20 Stdn. lang extrahiert. Der wäßrige Extrakt wurde eingengt und anschließend mit Äthylacetat-Methanol (95 + 5) mehrmals ausgeschüttelt. Die vereinigten Äthylacetatausschüttelungen wurden zur Trockene eingedampft und zur weiteren Aufarbeitung in Methanol aufgenommen.

### Sorptionsmaterial und Fließmittel

1. DC, zweidimensional auf Cellulose-Alufolie (Merck)
  - 1.1. LMS I: Chloroform-Essigsäure (2+1) mit Wasser gesättigt <sup>12</sup>

LMS II: Essigsäure-Wasser (3+7)

- 1.2. LMS I: Essigsäure-Wasser (15+85)  
LMS II: n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4+1+5) <sup>13</sup>
2. DC, zweidimensional auf Polyamid 11 (MN)
  - 2.1. LMS I: Wasser-Äthanol-Äthylmethylketon-Acetylacetone (65+15+15+5) <sup>1, 2</sup>  
LMS II: Chloroform-Methanol-Äthylmethylketon (60+26+14) fast mit Wasser gesättigt <sup>1, 2</sup>
3. DC, zweidimensional auf Kieselgelplatte bzw. Alufolie (Merck)
  - 3.1. LMS I: Essigsäure-Chloroform (1+9) <sup>14</sup>  
LMS II: Äthylacetat-Benzol (45+55) <sup>14</sup>
4. PC, zweidimensional auf Whatman 1
  - 4.1. LMS I: i-propanol-Ammoniak (konz.)-Wasser (8+1+1) <sup>15</sup>  
LMS II: Benzol-Propionsäure-Wasser (2+2+1) <sup>15</sup>
5. DC, eindimensional auf Kieselgelplatte bzw. Alufolie (Merck)
  - 5.1. LMS I: Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (5+4+1) <sup>16</sup>
  - 5.2. LMS I: Äthylacetat-Äthylmethylketon-Ameisensäure-Wasser (5+3+1+1) <sup>16</sup>
6. DC, eindimensional auf Polyamid 11 (MN)
  - 6.1. LMS I: Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (5+4+1) <sup>16, 17</sup>
  - 6.2. LMS I: Chloroform-Methanol-Äthylmethylketon-Acetylacetone (70+10+5+1) <sup>18</sup>
7. PC, eindimensional auf S & S 2043 b
  - 7.1. LMS I: Äthylacetat-Pyridin-Wasser (2+1+2) <sup>19</sup>
  - 7.2. LMS I: n-Butanol-Äthanol-Wasser (9+1+10)
  - 7.3. LMS I: n-Butanol-Pyridin-Wasser (6+4+3) <sup>20</sup>

### Isolierung der Flavonoide

Cellulosesäule (MN 2.100), Elutionsmittel Wasser. Der Verlauf der Chromatographie wurde mit Hilfe von DC in mehreren Fließmitteln verfolgt. Die weitere Verteilung bzw. Reinigung erfolgte auf Polyamidsäulen (MN Polyamid SC<sub>6</sub>) mit Methanol-Wasser (1+1). Die Verbindungen **1** und **2** konnten so rein erhalten werden.

Die Aglykone trennten wir auf Polyamidsäulen, als Desorptionsmittel diente Chloroform-Methanol-Äthylmethylketon (60+26+14). Die Verbindungen **3**, **4**, **5**, **6** wurden jeweils durch präparative PC (45- bzw. 60-proz. Essigsäure oder zweidimensional auf dem Fließmittel 1.1.) rein gewonnen.

### UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit dem „Unicam Sp 1800 Ultraviolet Spektrophotometer“ mit Automatschrei-

ber in etwa 95-proz. Äthanol für Spektroskopie aufgenommen<sup>3</sup>.

Die  $\text{AlCl}_3$ -,  $\text{NaOAc}$ -,  $\text{NaOAc-H}_3\text{BO}_3$ - und  $\text{NaOH}$ -Spektren wurden nach<sup>4-8</sup> durchgeführt.

#### Säurehydrolyse

Die Verbindungen wurden mit 2 N  $\text{HCl}$  hydrolysiert. Die Zuckeranteile wurden mit den Fließmitteln 7.1., 7.2. und 7.3. und einer Reihe von authentischen Hexosen und Pentosen als Vergleichssubstanz chromatographiert. Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit Anilinphthalat<sup>21,22</sup> bzw. Naphthoresorcin (Naphthalindiol-(1,3)-Phosphorsäure<sup>23</sup>, anschließend 10 min auf 105 °C erhitzen.

#### Alkaliabbau

Die Alkalihydrolyse wurde mit 10-proz.  $\text{KOH}$ -Lösung vorgenommen<sup>9</sup>. Die Identifizierung der Spalt-

produkte erfolgte chromatographisch mit dem Fließmittel 3.1. für die phenolische- und 4.1. für die Säurekomponente. Zur Sichtbarmachung wurden diazotiertes *p*-Nitroanilin<sup>24</sup> bzw. diazotierte Sulfanilsäure<sup>25</sup> und Natriumcarbonat verwendet. Die UV-Messung der Absorptionsmaxima der Säureanteile wurde nach den Angaben von<sup>9</sup> durchgeführt.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen erschien eine Arbeit von VALESÍ *et al.*<sup>26</sup>, in welcher über einige Flavonoid-Aglycone in *Larrea cuneifolia* berichtet wurde.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß Kämpferol-3-methyläther und Quercetin-3'-methyläther in beiden Species vorkommen.

Mr. SUNG HONG OH danke ich für seine gewissenhafte technische Assistenz.

Für die wertvolle Diskussion möchte ich Herrn Prof. Dr. M. WICHTL meinen Dank aussprechen.

<sup>1</sup> K. EGGER u. M. KEIL, Z. analyt. Chem. **210**, 201 [1965].

<sup>2</sup> K. EGGER, Dünnschicht-Chromatographie [Hrsg. v. E. Stahl], S. 669, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, [1967].

<sup>3</sup> J. J. CHIRIKDJIAN u. W. BLEIER, Sci. pharm. [Wien] **39**, 65 [1971].

<sup>4</sup> L. JURD, The Chemistry of Flavonoid Compounds [Hrsg. T. A. GEISSMANN], Pergamon Press [Oxford] [1962].

<sup>5</sup> L. JURD, Phytochemistry **8**, 445 [1969].

<sup>6</sup> L. JURD u. R. M. HOROWITZ, J. org. Chemistry **22**, 1618 [1957].

<sup>7</sup> L. JURD, Arch. Biochem. Biophysics **63**, 376 [1956].

<sup>8</sup> J. J. CHIRIKDJIAN u. W. BLEIER, Sci. pharm. [Wien] **40**, 119 [1972].

<sup>9</sup> J. J. CHIRIKDJIAN, E. JAAG u. P. SPIEGL, Mh. Chem. **100**, 1105 [1969].

<sup>10</sup> K. V. RAO u. T. R. SESHADRI, J. Chem. Soc. [London] **1944**, 122.

<sup>11</sup> K. JENTZSCH, P. SPIEGEL u. J. J. CHIRIKDJIAN, Naturwissenschaften **57**, 92 [1970].

<sup>12</sup> K. EGGER, J. Chromatogr. [Amsterdam] **5**, 74 [1961].

<sup>13</sup> S. M. PARTRIDGE, Biochem. J. **42**, 238 [1948].

<sup>14</sup> H. M. HURST u. J. B. HARBORNE, Phytochemistry **6**, 1111 [1967].

<sup>15</sup> M. D. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW u. P. E. WALL, J. biol. Chemistry **218**, 293 [1956].

<sup>16</sup> E. STAHL u. P. J. SCHORN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **325**, 263 [1961].

<sup>17</sup> W. BLEIER u. J. J. CHIRIKDJIAN, J. Chromatogr. [Amsterdam] **62**, 156 [1971].

<sup>18</sup> K. EGGER, Planta med. [Stuttgart] **12**, 265 [1964].

<sup>19</sup> M. A. JERMYN u. F. A. ISHERWOOD, Biochem. J. **44**, 402 [1949].

<sup>20</sup> F. CRAMER, Papierchromatographie 3. ergänzte Aufl., Verl. Chemie [1954].

<sup>21</sup> S. M. PARTRIDGE, Nature [London] **164**, 443 [1949].

<sup>22</sup> W. PESCHKE, J. Chromatogr. [Amsterdam] **20**, 572 [1965].

<sup>23</sup> K. G. KREBS, D. HEUSSER u. H. WIMMER, Dünnschicht-Chromatographie [Hrsg. E. Stahl] 2. Auflage, S. 840, Springer-Verlag [Berlin, Heidelberg, New York] [1967].

<sup>24</sup> H. G. BRAY, W. V. THORPE u. K. WHITE, Biochem. J. **46**, 271 [1950].

<sup>25</sup> B. N. AMES u. H. K. MITCHELL, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 252 [1952].

<sup>26</sup> A. G. VALESÍ, E. RODRIGUEZ, G. VANDER VELDE u. T. J. MABRY, Phytochemistry **11**, 2821 [1972].