

# Iridoide aus *Clerodendrum thomsonae* Balf. f., Verbenaceae

Iridoids in *Clerodendrum thomsonae* Balf. f., Verbenaceae

Gabriele Lammel [1] und Horst Rimpler

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg, Schänzlestr. 1, D-7800 Freiburg

Z. Naturforsch. **36 c**, 708–713 (1981); received June 25, 1981

Iridoids, 8-O-Acetylmioporusid, *Clerodendrum*, NMR, MS

*Clerodendrum thomsonae* Balf. f. has been examined for iridoids. Besides the known compounds melittoside, aucubin, 8-O-acetylharpagide, reptoaside and ajugoside a new iridoid, 8-O-acetylmioporuside, has been isolated using SC and HPLC. The structure and relative configuration of the new compound have been determined by spectroscopic methods (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS) and by correlation with mioporuside.

## Einleitung

Die Gattung *Clerodendrum* gehört mit etwa 400 Arten zu den artenreichsten der Verbenaceae. Bisher sind 12 Arten hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe genauer untersucht worden. Besonders häufig wurden Flavone, die teils frei, teils als Glucuronide vorliegen [2–7] und ubiquitär vorkommende Phytosterine und Triterpene wie z. B.  $\beta$ -Sitosterol,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrin gefunden. In mehreren *Clerodendrum*-Arten wurde außerdem 24-S-Ethylcholesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol nachgewiesen [8–11], dessen Akkumulation möglicherweise ein charakteristisches Merkmal der Gattung ist [11, 12]. Aus 6 der untersuchten Arten wurden Diterpene (*Clerodendrine A, B, Epi-*caryoptin, Clerodin [10, 13–16] isoliert.

Hinsichtlich des Iridoidvorkommens gibt es bislang nur die Arbeit von Kooiman [17], der verschiedene Pflanzenteile von 13 *Clerodendrum*-Arten mittels Papierchromatographie testete und dabei in vegetativen Teilen von *Clerodendrum thomsonae* 3 Iridoidglykoside unbekannter Struktur nachwies. Wir haben nun *Clerodendrum thomsonae* präparativ aufgearbeitet und insgesamt 6 verschiedene Iridoidglykoside isoliert und identifiziert. Die chemotaxonomische Verwertbarkeit dieser Ergebnisse soll im Rahmen einer Breitenuntersuchung der Gattung *Clerodendrum* in einer späteren Arbeit diskutiert werden.

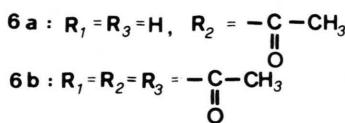
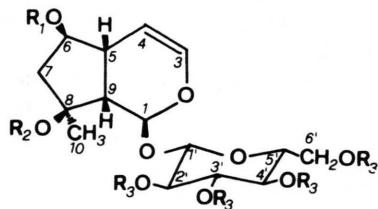
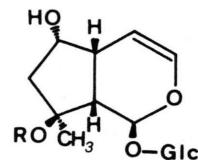
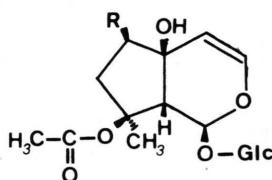
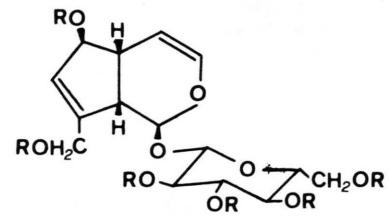
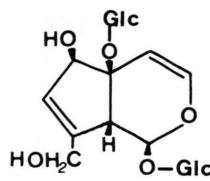
## Ergebnisse

5 der isolierten Iridoidglykoside waren bekannt und konnten durch Vergleich mit authentischen

Substanzen eindeutig identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Melittosid (**1**), Aucubin (**2a**), Acetylharpagid (**3**), Ajugosid (**4**) und Reptoaside (**5**). Die spektroskopischen Daten des 6. Iridoidglykosids (**6a**) stimmten mit keiner der bekannten Verbindungen überein. Für die Iridoidstruktur von **6a** sprechen die UV-( $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$  188 nm,  $\log \epsilon = 3,7$ ), IR- ( $\nu = 1717 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1654 \text{ cm}^{-1}$ ) und die <sup>1</sup>H-NMR-Daten (siehe Tab. I). Außerdem gibt **6a** wie die meisten Iridoide [18] beim Erhitzen mit wässrigen Säuren einen dunklen Niederschlag und eine gefärbte Lö-

Tabelle I. <sup>1</sup>H-NMR-Daten von **6a**,  $\delta$ -Skala,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP-d<sub>4</sub>Na = 0 ppm Kopplungskonstanten in Hz, s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, m = Multiplett, \* verbreitetes Signal, + berechnete Werte nach Emsley *et al.* [22].

C (1) H	5,83 s*	
	$J_{1,9} = 1,5$	
C (3) H	6,32 dd	
	$J_{3,4} = 6,5$ , $J_{3,5} = 2$	
C (4) H	5,0 dd	
	$J_{3,4} = 6,5$ , $J_{4,5} = 1,5$	
C (5) H	2,89 m	
C (6) H	4,47 m	
	$J_{5,6} = 6$	
C (7 $\alpha$ ) H	2,30 + dd	
	$J_{6,7\alpha} = 5,8$ +	
C (7 $\beta$ ) H	1,84 + dd	
	$J_{6,7\beta} = 11,2$ +, $J_{7\alpha,7\beta} = -13,5$	
C (9) H	2,69 d	
	$J_{1,9} = 1,5$ , $J_{9,5} = 7$	
C (10) H <sub>3</sub>	1,53 s	
$\text{--C}(\text{---CH}_3)\text{---}$	2,03 s	
O		
C (1') H	4,76 d	
	$J_{1',2'} = 7,5$	



sung, in der sich dünnenschichtchromatographisch Glucose nachweisen läßt. Die Stellung der funktionellen Gruppen läßt sich bei Annahme einer Iridoidgrundstruktur folgendermaßen ableiten: Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist das C(3)-H Signal ein Doppeldublett. Durch Spinentkopplung konnte gezeigt werden, daß eine Fernkopplung zum C(5)-H besteht. Das C(4)-H Signal erscheint ebenfalls als

breites Doppeldublett. Die C-Atome 4 und 5 sind also unsubstituiert. Außerdem sind eine Acetoxygruppe und eine Hydroxygruppe vorhanden. Nach Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von **6a** mit denen von Mioporosid (**7**) [19], Ajugol (**8**) und **4** [20] ist zu erwarten, daß die Acetoxygruppe an C(8) steht und  $\beta$ -ständig ist, da die C(9)-H-, C(10)-H<sub>3</sub>- und C(1)-H-Signale von **6a** gegenüber denen von **7** signifikant

Tab. II. Vergleich einiger  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von **7**, **8**, und **4** mit Daten von **6a**.

	<b>7</b>	<b>6a</b>	<b>8</b>	<b>4</b>
O-C(=O)-CH <sub>3</sub>	–	2,03 s	–	2,09 s
C(9) H	2,38 dd	2,69 d	2,68 d	2,91 s*
C(1) H	5,58 d	5,82 s*	5,55 d	5,93 s*
C(10) H <sub>3</sub>	1,44 s	1,53 s	1,35 s	1,47 s

zu tieferem Feld verschoben sind (siehe Tab. II) [21]. Die Verschiebungen haben die gleiche Richtung und Größenordnung wie beim Vergleich von **8** und **4**.

Das Signal der Methylenprotonen am C(7) erscheint als AB-Teil eines ABX-Systems; das Multiplett des C(6)-H läßt sich durch Spinentkopplung (C(5)-H) zum X-Teil dieses ABX-Systems vereinfachen. Die Kopplungskonstanten wurden dann nach Emsley *et al.* [22] berechnet. Die Konformation des Cyclopantanringes und die relative Konfiguration an C(6) wurden durch Vergleich der experimentell ermittelten Kopplungskonstanten mit den nach Steyn und Sable [23] für alle twist (T)- und envelope (V)-Konformationen errechneten Werten diskutiert (vgl. [20]). Eine Übereinstimmung zwischen den 3 Wertepaaren ergibt sich für die  $^7\text{T}_8$ - und die  $^7\text{V}$ -Konformationen, wenn die OH-Gruppe am C(6) oberhalb der Ringebene ( $\beta$ ) steht und für die  $^6\text{T}_5$ , die  $^6\text{V}$ - und die  $^6\text{T}_7$ -Konformationen, wenn die OH-

Gruppe an C(6) unterhalb der Ringebene ( $\alpha$ ) stehen würde (siehe Tab. III). Diese Konformationen sind nur mit einer *cis*-Verknüpfung der Ringe vereinbar. Eine  $\alpha$ -Stellung der C(6)-OH-Gruppe scheidet aus, da **6a** dann mit **4** identisch sein müßte. Aus der Größe der Kopplungskonstanten  $J_{1,9}$  schließen wir auf eine *trans*-Anordnung der Protonen, wobei das C(1)-H aequatorial, das C(9)-H axial angeordnet ist.

Der Beweis, daß es sich bei **6a** um das 6-Epimere von **4** handelt, gelang durch Acetylierung von **6a** zum Hexaacetat (**6b**), das IR-spektroskopisch als Mioporosidhexaacetat identifiziert wurde. **6a** ist demnach 8-O-Acetylmioporosid.

Mit dieser Struktur sind auch die Daten der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie (siehe Tab. IV) im Einklang. Für die  $\beta$ -Stellung der 8-OH-Gruppe spricht die Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen von C-1 und C-9 mit Werten der Literatur [24]; die durch Acetylierung der 8-OH-Gruppe zu erwartende Verschiebung von C-8 zu tieferem, C-7, C-9 und C-10 zu höherem Feld war, wie ein Vergleich mit **8** ergab, ebenfalls zu beobachten. Die von der Konfiguration am C-6 abhängigen  $\gamma$ -Effekte auf die chemischen Verschiebungen von C-4 und C-8 [24] konnten ebensowenig wie der  $\delta$ -Effekt auf C-3 überprüft werden, da  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **4** nicht verfügbar waren.

Ein Vergleich der Massenspektren von **4** und **6a** zeigte, daß die Konfiguration am C-6 einen deutlichen Einfluß auf die Fragmentierung ausübt. Aus der relativen Intensität der wichtigsten Massen-

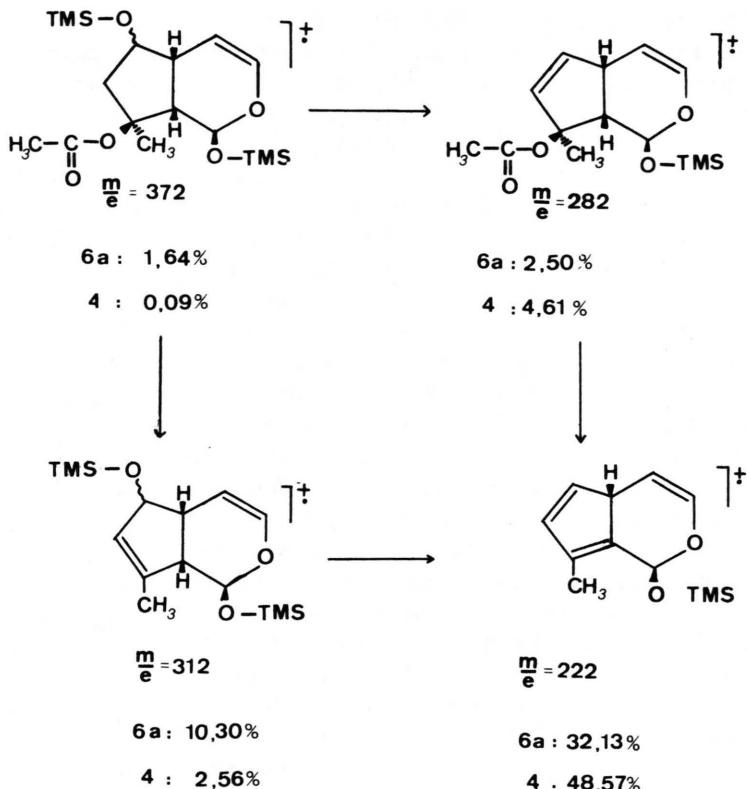
Tab. III. Übersicht über die Konformationen, bei denen experimentell und nach Steyn und Sable [23] errechnete Kopplungskonstanten übereinstimmen.

Kopplungs-konstante	gemessen [Hz]	berechnet [Hz]	mögl. Konformation
$J_{5\beta, 6\alpha}$	6	5,2	
$J_{6\alpha, 7\alpha}$	5,8	6,5	$^7\text{T}_8$
$J_{6\alpha, 7\beta}$	11,2	8,5	
$J_{5\beta, 6\alpha}$	6	7,2	
$J_{6\alpha, 7\alpha}$	5,8	5,4	$^7\text{V}$
$J_{6\alpha, 7\beta}$	11,2	9,4	
$J_{5\beta, 6\beta}$	6	5,1	
$J_{6\beta, 7\beta}$	5,8	6,5	$^6\text{T}_5$
$J_{6\beta, 7\alpha}$	11,2	8,5	
$J_{5\beta, 6\beta}$	6	5,4	
$J_{6\beta, 7\beta}$	5,8	5,4	$^6\text{V}$
$J_{6\beta, 7\alpha}$	11,2	9,4	
$J_{5\beta, 6\beta}$	6	6,5	
$J_{6\beta, 7\beta}$	5,8	5,1	$^6\text{T}_7$
$J_{6\beta, 7\alpha}$	11,2	9,6	

Tab. IV.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **6a**,  $\delta$ -Skala, CD<sub>3</sub>OD, TMS = 0 ppm off-resonance-Signale: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett.

Acetyl – C=O	173,29 s
C-1	94,09 d
C-3	142,00 d
C-4	101,32 d
C-5	37,06 d
C-6	71,92 d
C-7	47,42 t
C-8	88,05 s
C-9	49,26 d
C-10	22,45 q
Acetyl – CH <sub>3</sub>	22,23 q
C-1'	99,97 d
C-2'	74,78 d
C-3'	78,02 d
C-4'	71,65 d
C-5'	78,02 d
C-6'	62,91 t

Abb. 1. Wichtige Fragmente im Massenspektrum der TMS-Aether von 8-O-Acetylmioporosid **6a** und Ajugosid **4**.



zahlen lässt sich ableiten, daß bei **4** die Abspaltung von TMSOH leichter erfolgt als bei **6a** (siehe Abb. 1).

## Material und Methoden

Das Pflanzenmaterial wurde durch eigenen Anbau gewonnen; ein Belegexemplar befindet sich im Herbar des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg.

Bei der HPLC wurde mit folgender Gerätekombination gearbeitet: Pumpen 6000 A, Differential-Refraktometer R 401 (Waters); Spektral Detektor SF 770 (Schoeffel); Probensammeleinrichtung PWK C 7400 (Siemens). Als Säulenmaterialien wurden für analytische Zwecke Porasil (Waters) und  $\mu$ -Bondapak-C<sub>18</sub> (Waters), für präparative Zwecke Partisil 10 ODS (Whatman) verwendet. Als Fließmittel wurden Dichlormethan-Methanol-Wassergemische (90:10:1 – 70:30:3) und Methanol-Wassergemische 10–35% verwendet.

Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian T 60 Spektrometer aufgenommen, für Spinentkoppl-

lungsexperimente wurde mit einem Bruker WH 250 Gerät gearbeitet. Die <sup>13</sup>C-NMR-Daten wurden mit einem Bruker WH 90 Puls Spektrometer gemessen.

GC/MS: Gaschromatograph 9610 Finnigan, gekoppelt mit Finnigan 4000 Massenspektrometer. Verwendete Säulen: Glas 2 m, OV 225, 3%, Gaschrom Q 80–100 mesh; Glas 4 ft, OV 17,3%, Chromosorb W 80–100 mesh. Ionenquellen- und Säulentemperatur 210 °C (OV 225 Säule); Ionenquelle 220 °C, Säulentemperatur 290 °C (OV 17 Säule). Die Iridoidglykoside wurden mit TMSi-S Universalreagenz (Serva) silyliert: Je 0,3 mg Substanz wurden mit 30 µl TMSi-S 2 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt.

Für die IR-Spektroskopie verwendeten wir ein Beckman-Microlab-600-Gerät, für UV-Spektren ein Uvikon-820-Gerät.

## Isolierung

700 g des gefriergetrockneten und gemahlenen Pflanzenmaterials wurden mit 7 l reinem Ethanol und danach zweimal mit 4 l 70% Ethanol je 30

Minuten lang unter Rückfluß erhitzt. Die vereinigten Extrakte wurden auf etwa 150 ml eingeengt, anschließend mit 320 g Celite 545 verrieben und im Vakuum über Kieselgel vollständig getrocknet. Der an Celite gebundene Rohextrakt (155 g) wurde an einer Celitesäule aufgetrennt. Durch Elution mit Hexan/Dichlormethan 1:1 erhielten wir eine lipophile Fraktion; anschließende Elution mit Dichlormethan/Methanol 1:1 ergab die hydrophile Fraktion. Der hydrophile Anteil (52,5 g) wurde erneut an Celite gebunden und nach der Trocknung im Vakuum an Kieselgelsäulen mit Dichlormethan-Methanol-Wassergemischen (80:20:2 – 70:30:3) getrennt und an Sephadex G 15 durch Elution mit Wasser weiter aufgereinigt. Auf diese Weise wurden in der ersten Fraktion die Iridoide **5**, **3**, **4**, **6a**, in der zweiten Fraktion **2a** und in der dritten Fraktion **1** angereichert. Aus der dritten Fraktion kristallisierte beim Stehen in methanolischer Lösung insgesamt 1,28 g **1** aus (0,18% bezogen auf das Trockengewicht der Droge); die Iridoidmenge aus der zweiten Fraktion war deutlich geringer (0,1%). Da bei der ersten Fraktion nur die Hauptmenge von **3** und **5** mit den beschriebenen säulenchromatographischen Verfahren isoliert werden konnten, wurde zur Abtrennung von **4** und **6a** über HPLC getrennt. Die Konzentration der 6-Epimeren **4** und **6a** ist von allen in *Clerodendrum thomsonae* enthaltenen Iridoiden am niedrigsten (unter 0,05%).

#### Identifizierung

Bekannte Verbindungen wurden durch direkten Vergleich mit authentischen Substanzen identifiziert.

- 1:** DC, HPLC, IR, NMR, MS
- 2a:** DC, HPLC, **2b:** IR
- 3:** DC, HPLC, IR
- 4:** DC, HPLC, IR, MS
- 5:** DC, HPLC, IR, NMR

Als Fließmittel für die DC von Iridoidglykosiden wurden Dichlormethan-Methanol-Wassergemische (80:20:2 – 70:30:3), für Zucker Acetonitril-Schweifelkohlenstoff-Wasser (85:5:10) verwendet. Als Sprühreagenz verwendeten wir Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### Acetylierung

30 mg **6a** wurden 20 Stunden lang bei Raumtemperatur mit 3 ml einer Mischung von Pyridin/Acet-

anhydrid (1:1) umgesetzt. Das Gemisch wurde auf Eis gegossen und dann mit Ether ausgeschüttelt. Die aetherische Phase wurde nacheinander mit 0,1 N HCl, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeengt. Durch Kristallisation aus absolutem Ethanol erhielten wir 26 mg **6b**, Schmelzpunkt 174–175 °C. Bei der Acetylierung von **2a** verfuhren wir analog.

#### Eigenschaften der Verbindungen

**6a:**  $[\alpha]_D^{22} = -151,8$  (*c* = 2,0 MeOH).

Massenspektrum der silylierten Verbindung: *m/e* (% Basispeak) 451 (0,77), 435 (0,56), 372 (1,64), 361 (84,51), 331 (8,68), 319 (6,34), 312 (10,3), 283 (2,5), 271 (14,14), 243 (10,41), 223 (90,0), 222 (32,13), 217 (37,57), 204 (18,73), 193 (7,01), 192 (6,05), 191 (30,25), 169 (18,71), 147 (32,63), 133 (20,77), 129 (22,68), 103 (33,27), 73 (100).

IR (KBr): 3400 cm<sup>-1</sup> (m), 2920 cm<sup>-1</sup> (w), 1717 cm<sup>-1</sup> (s), 1708 cm<sup>-1</sup> (s), 1654 cm<sup>-1</sup> (m), 1374 cm<sup>-1</sup> (m), 1260 cm<sup>-1</sup> (s), 1074 cm<sup>-1</sup> (m), 1033 cm<sup>-1</sup> (w), 1013 cm<sup>-1</sup> (w), 961 cm<sup>-1</sup> (w).

**6b:** IR (KBr): 2910 cm<sup>-1</sup> (m), 1746 cm<sup>-1</sup> (s), 1723 cm<sup>-1</sup> (s), 1659 cm<sup>-1</sup> (w), 1429 cm<sup>-1</sup> (m), 1364 cm<sup>-1</sup> (s), 1254 cm<sup>-1</sup> (s), 1228 cm<sup>-1</sup> (s), 1057 cm<sup>-1</sup> (w), 1035 cm<sup>-1</sup> (w), 1014 cm<sup>-1</sup> (w), 958 cm<sup>-1</sup> (s), 868 cm<sup>-1</sup> (w).

**1:** Massenspektrum der silylierten Verbindung: *m/e* (% Basispeak) 539 (0,25), 451 (0,25), 398 (2,97), 361 (15,37), 309 (2,63), 308 (0,59), 297 (1,95), 271 (2,71), 243 (3,05), 219 (5,09), 218 (6,54), 217 (24,46), 204 (11,29), 191 (10,96), 169 (4,5), 147 (16,48), 129 (9,85), 103 (16,39), 73 (100).

#### Danksagung

Für die Überlassung von authentischen Vergleichsstoffen danken wir Prof. C. Trogolo, Istituto di Chimica Organica, Università di Roma (Melittosid, Ajugosid, Mioporosidhexaacetat) und Prof. O. Sticher, ETH Zürich (Reptosid).

Für die Aufnahme der <sup>13</sup>C-NMR-Spektren danken wir Herrn A. Hasenhindl, Institut für makromolekulare Chemie der Universität Freiburg.

Für die Aufnahme von 60 MHz-NMR-Spektren danken wir Herrn V. Brecht, Institut für Pharmazie der Universität Freiburg; für die Aufnahme der

250-MHz-NMR-Spektren und die Entkopplungsexperimente danken wir Herrn Dr. D. Hunkler, Institut für organische Chemie der Universität Freiburg.

Für die Durchführung der GC/MS-Analysen danken wir Frau M. Weber, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg.

- [1] Die Ergebnisse sind Teil der Dissertation G. Lammel, Universität Freiburg, in Vorbereitung.
- [2] S. S. Subramanian and A. G. R. Nair, Phytochemistry **11**, 3095 (1972).
- [3] S. S. Subramanian and A. G. R. Nair, Phytochemistry **12**, 1195 (1973).
- [4] S. S. Subramanian, A. G. R. Nair, and T. N. C. Vedantham, Indian J. Pharm. **35**, 191 (1973).
- [5] T. N. C. Vedantham, S. S. Subramanian, and J. B. Harborne, Phytochemistry **16**, 294 (1977).
- [6] M. Okigawa, H. Hatanaka, N. Kawano, I. Matsunaga, and Z. Tamura, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **19**, 148 (1971).
- [7] N. Morita, M. Arisawa, and H. Ozawa, Yakugaku Zasshi **97**, 976 (1977).
- [8] L. Prakash and G. Garg, Pharmazie **35**, 500 (1980).
- [9] L. M. Bolger, H. H. Rees, E. L. Ghisalberti, L. J. Goad, and T. W. Goodwin, Tetrahedron Lett. **1970**, 3043.
- [10] K. C. Joshi, P. Singh, and A. Mehra, Planta Med. **37**, 64 (1979).
- [11] S. S. Subramanian, A. G. R. Nair, and T. N. C. Vedantham, Phytochemistry **12**, 2078 (1979).
- [12] A. G. R. Nair, T. N. C. Vedantham, and B. Kannabiran, Curr. Sci. **48**, 441 (1979).
- [13] N. Kato, N. Shibayama, and K. Munakata, J. Chem. Soc. Perkin Trans I, **7**, 712 (1973).
- [14] S. Hosozawa, N. Kato, and K. Munakata, Phytochemistry **13**, 308 (1974).
- [15] D. H. R. Barton, H. T. Cheung *et al.* J. Chem. Soc. **1961**, 5061.
- [16] D. Rogers, G. G. Ünal, D. J. Williams, and S. V. Levy, J. Chem. Soc. Chem. Commun. **3**, 97 (1979).
- [17] P. Kooiman, Acta Bot. Neerl. **24**, 459 (1975).
- [18] A. R. Trimm and R. Hill, Biochem. J. **50**, 310 (1952).
- [19] A. Bianco, M. Guiso, C. Iavarone, and C. Trogolo, Gazz. Chim. Ital. **105**, 175 (1975).
- [20] M. Guiso, R. Marini-Bettolo, and A. Agostini, Gazz. Chim. Ital. **104**, 25 (1974).
- [21] H. Rimpler, Planta Med. **33**, 313 (1978).
- [22] J. W. Emsley, L. H. Sutcliffe, J. Feeney, High Resolution Nuclear Resonance Spectroscopy, Vol. 1, Pergamon Press, Oxford 1965.
- [23] R. Steyn and H. Z. Sable, Tetrahedron **27**, 4429 (1971).
- [24] R. K. Chaudhuri, F. Ü. Afifi-Yazar, and O. Sticher, Tetrahedron **36**, 2317 (1980).