

Ellagitannine aus den Blättern von *Vitis vinifera*

Ellagitannins from the Leaves of *Vitis vinifera*

Christian Karl, Gerhard Müller und Peter Alsted Pedersen

Weleda AG, D-7070 Schwäbisch Gmünd

Z. Naturforschung 38 c, 13–16 (1983); received September 28, 1982

Vitis vinifera L., Vitaceae, Tannins, Fast-Atom-Bombardement-MS.

From methanolic extracts of dried leaves of *Vitis vinifera* 3 ellagitannins were isolated: brevilagin 1, 1,3-digalloyl-4,6-dehydrohexahydroxydiphenylglucose (= vitilagin), 3,4-digalloyl-1,6-dehydrohexahydroxydiphenylglucose (= iso-vitilagin).

Bei dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen der Blätter von *Vitis vinifera* waren drei gelb gefärbte Flecke aufgefallen, die zunächst für Flavonoide angesehen wurden. Ziel dieser Arbeit war, diese Stoffe zu isolieren und aufzuklären.

Die zahlreichen Untersuchungen der Blätter hatten vor allem die primären Inhaltsstoffe zum Gegenstand. Es liegen aber auch einige Untersuchungen über phenolische Substanzen vor. Gefunden wurden Catechine [1], kondensierte Gerbstoffe und Procyanidine [2], Phenolcarbonsäuren [3, 4], Monocaffeylewinsäure [5] und Flavonoide [4, 6].

Ergebnisse und Diskussion

Aus den getrockneten Blättern (Sorte Weißer Riesling) wurden die den DC-Flecken entsprechenden Substanzen A, B und C als intensiv dunkelgelbe kristalline Stoffe isoliert. Bei der sauren Hydrolyse ließen sich Glucose und Ellagsäure, bei B und C dazu noch Gallussäure nachweisen.

Ellagsäure liegt in den Ellagitanninen nicht als solche sondern als Hexahydroxydiphenylsäure [Ia] oder als Dehydrohexahydroxydiphenylsäure [Ib] vor [7]. Letztere bedingt die Farbigkeit der entsprechenden Ellagitannine und bildet bei saurer Hydrolyse neben Ellagsäure noch Brevifolincarbonsäure [8]. Diese ließ sich bei allen drei Substanzen nachweisen.

Schmidt und Mitarbeiter hatten die Existenz einer dritten Form der gebundenen Diphenylsäure, nämlich Isohexahydroxydiphenylsäure [Ic], in Ellagitanninen wie Terchebin [II] [9] und Isoterchebin [III] [10] angenommen. Nach neueren Untersuchungen japanischer Autoren liegt jedoch auch in diesen Gerbstof-

fen die Dehydrodiphenylsäure vor [11, 12], für die sie eine Struktur mit Phenoletherbindung vorschlagen, die beim Terchebin in wässriger Lösung in zwei isomeren Formen vorliegt (IVa–b). Im Isoterchebin soll eines der entsprechenden Isomeren (IVc) enthalten sein [12].

Substanz A ergab eine negative Reaktion auf gebundene und freie Ellagsäure, bildete Chlorellagsäure und Phenazinderivate wie Brevilagin 1 [7]. Ein direkter Vergleich mit authentischer Substanz bestätigte die Identität. Die PMR-Daten waren in Übereinstimmung mit den Angaben für Brevilagin 1, für dessen Diphenylsäure die Teilstruktur Ib angegeben wurde [16], aber auch mit denen für die Teilstruktur IV [12]. Die Struktur Ib muß allerdings als unvollständig angesehen werden. Gleichzeitig erklären die Strukturen IV die Unterschiede der chemischen Verschiebungen und der Kopplungen der allylischen Protonen, so daß angenommen werden darf, daß es sich bei der Dehydrodiphenylsäure immer um eine dieser Strukturen handelt. Da IVb im Gegensatz zu IVa eine allylische Kopplung zeigt [15], weisen die Singletts bei A auf die Strukturen IVa bzw. IVc hin.

Bei B und C sollte durch MS geklärt werden, wieviel Galloylreste im Molekül enthalten waren und ob die Iso- (Ic) oder eine Dehydrodiphenylsäure (Ib) oder IV vorlag. Eine Bestimmung der Molmasse gelang erst mit der noch relativ neuen Methode der FAB-MS (FAB = Fast Atom Bombardement), bei der die Probenoberfläche mit einem Strahl neutraler Atome (Argon, Xenon) beschossen und ionisiert wird [13, 14]. Substanz C zeigte im positiv-ion-FAB-MS einen $(M + H)^+$ -Peak bei m/e 803, Substanz B im negativ-ion-FAB-MS einen $(M - H)^-$ -Peak bei m/e 801,7. Demnach besitzen beide die molare Masse von 802 bzw. 802,7 (Genauigkeit der Me-

Sonderdruckanforderungen an Dr. C. Karl.

0341-0382/83/0100-0013 \$ 01.30/0

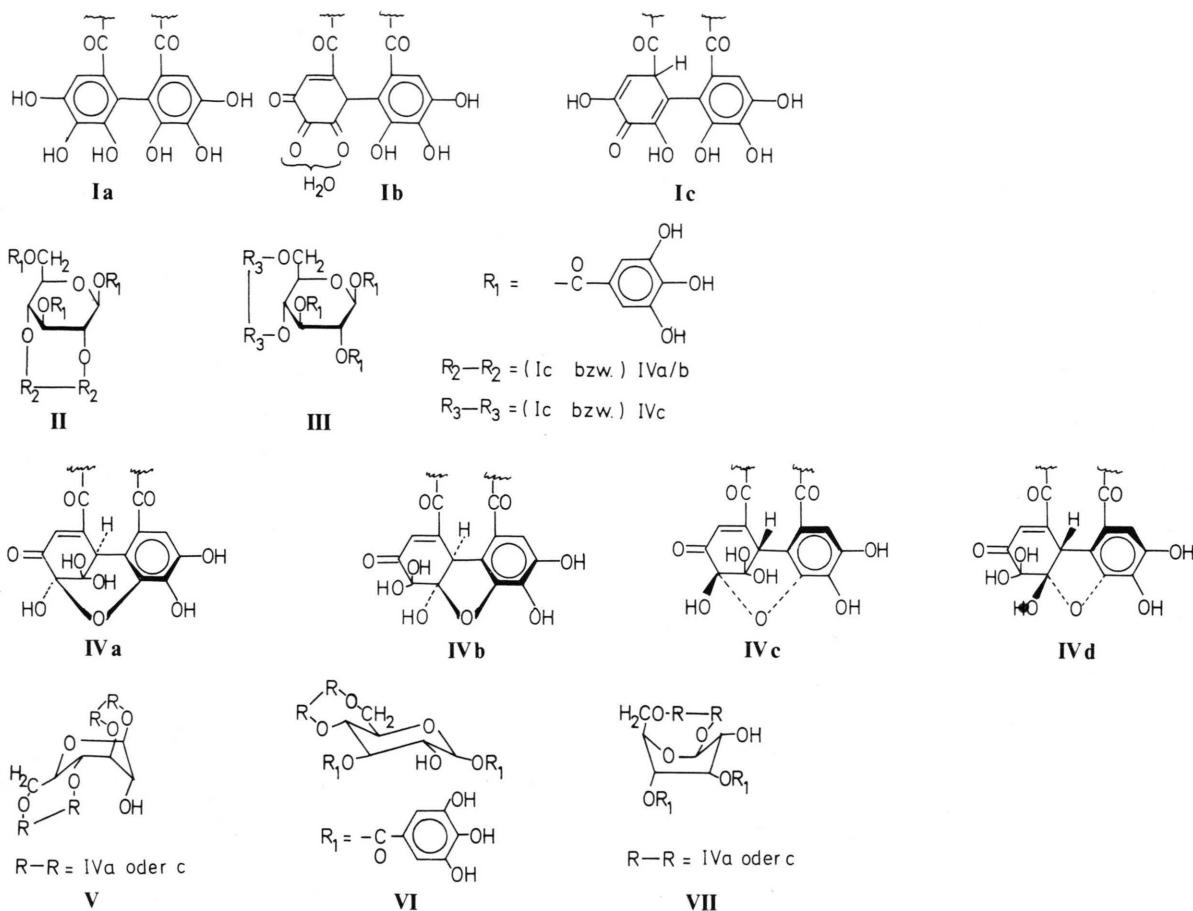


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.



thode $\pm 0,3 m/e$). Dies stimmt sehr gut mit dem für eine Digalloyldiphenoylglucose mit Teilstruktur **Ib** oder **IV**, $C_{34}H_{26}O_{23}$, berechneten Wert von 802,6 überein.

Parallel dazu versuchten wir, durch vorsichtige Hydrolyse nur mit Wasser Zwischenprodukte zu erhalten, die weiteren Aufschluß über die Konstitution geben könnten. Durch Schichtchromatographie konnte aus B und C eine Substanz a und aus B noch eine Substanz b isoliert werden. Substanz a ließ sich zu je 1 mol Glucose und Gallussäure hydrolyseren. Substanz b ging bei der Hydrolyse unter Abspaltung von Gallussäure in Substanz a über. Aus der Tatsache, daß sich nur B zu einer Digalloylglucose abbauen ließ, wurde gefolgert, daß in C ein Galloylrest glykosidisch in 1-Stellung der Glucose gebunden sein mußte.

Das PMR-Spektrum von B zeigte im aromatischen Bereich (δ 7,19 und 7,09 ppm) Singletts, 4 Protonen bzw. 2 Galloylresten entsprechend. Nach Einstrah-

lungsversuchen, wie von Fürstenwerth und Schildknecht [10] durchgeführt, wurden die Signale der Zuckerprotonen zugeordnet: H-1 bei δ 5,97 ppm (Dublett), H-2 bei δ 3,90 ppm (Multiplett), H-3 bei 4,94 ppm (perturbiertes Dublett), H-4 bei 4,13 ppm (Multiplett), H-5 bei δ 5,46 ppm (Doppeldoublett). Die Signale der C-6-Methylengruppe waren im Bereich δ 4,2 – 3,6 ppm vorhanden. Übrig blieben 3 Singletts (je 1 H) bei δ 6,70, 6,18 und 4,45 ppm, die der Diphensäure zuzuordnen waren. Die chemischen Verschiebungen stimmen mit den Literaturangaben für die Diphensäure des Isopterchbins, (**Ic**), [10] gut überein, stehen aber auch nicht im Widerspruch mit denen für **IVc** [12] und **Ib** [16]. Da aber [**Ic**] wegen seiner Molmasse als Möglichkeit ausscheidet und außerdem die PMR-Daten des Isopterchbins [10] nicht mit den früher veröffentlichten Daten für **Ic** übereinstimmen [16], enthält die Substanz B eine der Strukturen **IV** und zwar **IVa** oder **IVc** wegen des Fehlens allylischer Kopplungen.

Bei Deuterierung verschwand ein Signal bei δ 9,4 ppm (phenolische Protonen) und ein Signal bei δ 3,6 ppm (ein Zucker-Hydroxyl-Proton). Vergleicht man die chemischen Verschiebungen der Glucose-Protonen mit den bisher veröffentlichten Daten [10–12, 15, 16], so zeigen sie die beste Übereinstimmung mit einer 1.3.4.6-Substitution.

Das PMR-Spektrum von C unterschied sich wenig von B. Auch hier waren 2 Singletts mit 4 Protonen im aromatischen Bereich vorhanden. Die Zuckerprotonen wurden wie folgt zugeordnet: H-1 δ 5,73 ppm (Dublett), H-2 δ 3,50 ppm (Multiplett), H-3 δ 5,10 ppm (Multiplett), H-4 δ 4,88 ppm (Multiplett), H-5 δ 3,91 ppm (perturbiertes Dublett). Die Protonen der C-6-Methylengruppe lagen im Bereich δ 5,2–3,6 ppm. Bei Deuterierung verschwanden wie bei B Signale bei δ 9,2 ppm und 5,7 ppm.

3 Singletts (zusammen 2H) bei δ 6,73, 6,69 und 6,67 ppm sowie eines bei δ 4,54 ppm (1H) wurden der Diphensäure zugeordnet, die wie in A und B als **IVa** oder **IVc** vorlag, da keine allylischen Kopplungen auftraten. Auch bei Substanz C stimmen die chemischen Verschiebungen der Glucose-Protonen mit einer 1.3.4.6-Substitution überein.

Demnach war anzunehmen, daß die beiden Substanzen sich nur in der Art der „Verklammerung“ der Glucose mit der Dehydrodiphensäure unterschieden. Da die Verklammerung die Konformation der Glucose und damit nach der Karplus-Gleichung – wenn auch mit Einschränkungen – die 4 Kopplungskonstanten der Protonen H-1 bis H-5 beeinflußt, lassen sich aus letzteren unter Umständen die entsprechenden Rückschlüsse ziehen [16]. Bei Substanz C betrugen diese Kopplungskonstanten etwa 7 Hz. Dies ließ auf eine C1-Konformation schließen, in welcher nur eine 4.6-diequatoriale Verklammerung möglich ist. Substanz C war also 1.3-Digalloyl-4.6-dehydrohexahydroxy-diphenoylglucose (**VI**), für die wir den Namen Vitilagin vorschlagen. Substanz B hatte die Kopplungskonstante $J_{H1,H2} = 7,9$ Hz und $J_{H2,H3} = 6,5$ Hz, die beiden anderen Kopplungskonstanten konnten nicht genau ausgemessen werden, sie liegen aber mit Sicherheit unter 3 Hz. Diese Daten sprechen für eine B2-Konformation, bei der – wie Stereomodelle zeigen – eine 1.6- oder 3.6-Verklammerung denkbar ist. Da sich aus B eine Digalloylglucose hatte isolieren lassen, konnte die 3.6-Verklammerung ausgeschlossen werden. Substanz B war damit 3.4-Digalloyl-1.6-dehydrohexahydroxydiphenoylglucose (**VII**), die wir Isovitilagin

nennen. Ungeklärt bleibt bei beiden Substanzen, welche Säuregruppe der Diphensäure mit welcher Alkoholgruppe der Glucose verestert ist.

Abschließend scheint es uns bemerkenswert, daß unseres Wissens damit zum ersten Mal in der Ordnung Rhamnales Ellagitannine gefunden wurden [17].

Experimentelles

Geräte: UV-Spektren Perkin-Elmer Lambda 3. PMR-Spektren wurden auf einem Jeol FX 90 Q mit TMS als innerem Standard in DMSO als Lösungsmittel aufgenommen. Die FAB-Massenspektren wurden von der Fa. LAB-MS, D-7910 Neu-Ulm/Gerlenhofen auf einem VG Micromass 7035 unter folgenden Bedingungen registriert: Bombarding Gas Argon, Druck in der Ionenquelle 3×10^{-6} bar, Energie der Argonatome 8 keV, Lösungsmittel Glycerol.

Pflanzenmaterial: Getrocknete Blätter aus Vertragsanbau der Fa. Rittlinger, Sinsheim/Kraichgau (BRD), geerntet September 1977.

Isolierung: 3 kg getrocknete Blätter wurden mit 21 kg Methanol 14 Tage mazeriert. Das Mazerat wurde i. vac. zur Sirupdicke eingeengt. Chlorophyll wurde durch Filtration und Extraktion mit CCl_4 entfernt, danach wurde mit Lösungsmitteln steigender Polarität (Ethylether bis *n*-BuOH) fraktioniert extrahiert. Der Ethylacetat- und der *n*-BuOH-Extrakt (zusammen 28,2 g) wurden über Sephadex LH 20 mit EtOH 95% sc vorgetrennt, dann die einzelnen Fraktionen mit Ethylacetat/MeOH (8:2 (v/v))- und $CHCl_3$ /MeOH (9:1 bis 7:3 (v/v))-Gemischen weiter gereinigt und aufgetrennt. Neben Flavonglykosiden wurden 1600 mg Substanz A, 488 mg Substanz B und 266 mg Substanz C rein gewonnen.

Hydrolysen

- sauer: 1 mg Substanz wurde in 1 ml N HCl gelöst und 2 Stunden im geschlossenen Gefäß im Trockenschrank bei 100° aufbewahrt.
- wäßrig: 1 mg Substanz wurde in 1 ml Wasser gelöst und bei Zimmertemperatur unter ständiger dc Kontrolle 40 Tage aufbewahrt.

Chromatographie (DC): System I Cellulose, HOAc/ H_2O 60:40; System II Kieselgel, Ethylacetat/ $HCOOH/H_2O$ 70:14:21; System III Cellulose, HOAc/HCl 37%/ H_2O 8:2:2; System IV Cellulose, HOAc/ H_2O 6:94.

Brevilagin 1 (A): DC (R_f -Werte): I 0,49; II 0,57; III 0,47. Hydrolyse, sauer: Glucose, Ellagsäure, Brevifolincarbonsäure. $[\alpha]^{20^\circ}$ bei 589 nm: + 131° (Lit. [7] + 159,5°, getrocknete Substanz), bei 578 nm + 142°, bei 546 nm: + 188° (EtOH, $c = 1$, nicht getrocknet). UV λ_{max} nm (MeOH): 253. PMR (δ ppm): 9,5; 7,6 (breite Signale, Hydroxylprotonen); 6,95; 6,71; 6,56; 6,50; 4,65; 4,39 (Singletts der beiden Diphenosäuren); 6,21; 5,6; 5,0; 4,4; 3,5 (Multipletts der Zuckerprotonen). Derivatisierung: Chlorellagsäure und Phenazinderivate wie in [7].

3,4-Digalloyl-1,6-dehydrohexahydroxydiphenoylglucoside, Isovitilagin (B): Schmp.: ca. 235° unter Zersetzung. DC (R_f -Werte): I 0,50; II 0,66; III 0,49; IV 0,20. Hydrolyse, sauer: Glucose, Ellagsäure, Brevifolincarbonsäure, Gallussäure. Hydrolyse mit Wasser: Digalloylglucose, Monogalloylglucose, Glucose, Gallussäure, Ellagsäure. $[\alpha]^{20^\circ}$ bei 589 nm: + 82°, bei 578 nm: + 90°, bei 546 nm: + 119° (MeOH, $c = 0,36$). UV nm (MeOH): 279 (max), 255 (sh). FAB-MS m/e : 801,7 ($M-H^-$).

1,3-Digalloyl-4,6-dehydrohexahydroxydiphenoylglucoside, Vitilagin (C): Schmp.: 220 bis 228° unter Zersetzung. DC (R_f -Werte): I 0,54; II 0,52; III 0,54; IV 0,37. Hydrolyse, sauer: Glucose, Ellagsäure, Brevifolincarbonsäure, Gallussäure. Hydrolyse mit Wasser: Monogalloylglucose, Glucose, Gallussäure, Ellagsäure. $[\alpha]^{20^\circ}$ bei 589 nm: + 122°, bei 578 nm: + 133°, bei 546 nm: 172° (MeOH, $c = 0,33$). UV λ nm (MeOH): 279 (max), 255 (sh). FAB-MS m/e : 803 ($M + H$)⁺.

Dank

Wir danken Herrn Prof. Dr. W. Mayer (Heidelberg) für Proben von Brevilagin 1 und Terchebin und Herrn Dr. W. Gielsdorf (Neu-Ulm) für die Diskussion der MS-Spektren. Ferner gilt unser Dank dem Chemischen Laboratorium II der Universität Kopenhagen für die Aufnahme der NMR-Spektren. Das entsprechende Gerät wurde von „Statens Naturvidenskabelige Forskningsraad“ zur Verfügung gestellt.

- [1] L. A. Khabibullaeva u. R. L. Khazanovich, Tr. Tashkentsk Farmasevt. Inst. **3**, 167 (1962).
- [2] O. Bachmann u. R. Blaich, *Vitis* **18**, 106 (1979).
- [3] A. Rapp u. A. Ziegler, *Vitis* **12**, 226 (1973).
- [4] O. Bachmann, *Vitis* **17**, 234 (1978).
- [5] F. Vogel, Schweiz. Landwirtsch. Forsch. **17**, 57 (1978).
- [6] K. Egger, J. Reichling u. R. Ammann-Schweizer, *Vitis* **15**, 24 (1976).
- [7] O. Th. Schmidt, R. Schanz, R. Eckert u. R. Wurmb, *Liebigs Ann.* **706**, 131 (1967).
- [8] O. Th. Schmidt, R. Wurmb u. J. Schulz, *Liebigs Ann.* **706**, 180 (1967).
- [9] O. Th. Schmidt, J. Schulz u. R. Wurmb, *Liebigs Ann.* **706**, 169 (1967).
- [10] H. Fürstenwerth u. H. Schildknecht, *Liebigs Ann.* **1976**, 112.
- [11] T. Okuda, T. Hatano, H. Nitta u. R. Fujii, *Tetrahedron Letters* **21**, 4361 (1980).
- [12] T. Okuda, T. Hatano u. T. Yasui, *Heterocycles* **16**, 1321 (1981).
- [13] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, B. N. Green, V. C. Parr u. J. L. Gower, *Biomed. Mass Spectrom.* **9**, 11 (1982).
- [14] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick u. A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **63**, 325 (1981).
- [15] T. Okuda, T. Yoshida u. T. Hatano, *J. Chem. Soc. Perkin I* **1982**, 9.
- [16] J. C. Jochims, G. Taigel u. O. Th. Schmidt, *Liebigs Ann.* **717**, 169 (1968).
- [17] E. A. Haddock, R. K. Gupta, S. M. K. Al-Shafi, K. Layden, E. Haslam u. D. Magnolato, *Phytochemistry* **21**, 1049 (1982).