

Isolierung und Strukturaufklärung von Bartramia-Triluteolin, Bartramiasäure und einigen Biflavonoiden aus dem Laubmoos *Bartramia pomiformis**

Isolation and Structure Elucidation of Bartramia-Triluteolin, Bartramie Acid and Biflavonoids from the Moss *Bartramia pomiformis*

Tassilo Seeger, Hans Geiger und Hans Dietmar Zinsmeister

Fachrichtung Botanik, Universität des Saarlandes, D-W-6600 Saarbrücken, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **47c**, 527–530 (1992); eingegangen am 23. März 1992

Musci, Bartramiaceae, *Bartramia pomiformis* Hedw., Bartramia-Triluteolin (2',8'',2''',8''''-Triluteolin), Bartramie-Acid (Luteolin-8,2''-protocatechuic Acid), Triflavonoid, Biflavonoids

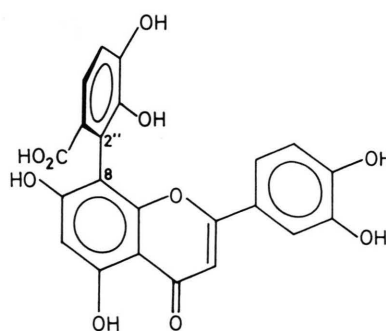
From *Bartramia pomiformis* bartramie-acid (luteolin-8,2''-protocatechuic acid), bartramia-triluteolin, the first triflavone and six known biflavonoids (bartramiaflavone, anhydrobartramiaflavone, 2,3-dihydrophilonotisflavone, philonotisflavone, dicranolomin and 5',3'''-dihydroxyamentoflavone) could be isolated. The structures of the new compounds were elucidated spectroscopically.

Das Laubmoos *Bartramia pomiformis* besitzt ein relativ komplexes Flavonoidmuster. Über die Hauptkomponente, ein doppelt verknüpftes makrozyklisches Biflavonoid, welches Bartramiaflavon genannt wurde, ist an anderer Stelle berichtet worden [1]. In Fortführung dieser Arbeit wurden an weiteren Biflavonoiden 2,3-Dihydrophilonotisflavon, Philonotisflavon, Dicranolomin, 5',3'''-Dihydroxyamentoflavon, sowie in Spuren das ursprünglich aus Bartramiaflavon durch Säurebehandlung dargestellte Anhydrobartramiaflavon gefunden [2]. Diese Verbindungen konnten durch ihre NMR-Spektren identifiziert werden. Von Dicranolomin war bislang nur das ¹H-NMR-Spektrum bekannt, das ¹³C-NMR-Spektrum, das hier erstmalig wiedergegeben wird (vgl. Tab. I) steht in vollem Einklang mit der Struktur.

An bislang unbekannten Verbindungen wurden ein saures Flavonoid sowie ein Triflavon isoliert und strukturell aufgeklärt.

Bei Verbindung **1** deuten die UV-Spektren (siehe Experimentelles) und das Fluoreszenzverhalten vor und nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A auf ein Flavon vom Luteolintyp hin. Das chromatographische Verhalten (h_{Rf} auf Zellulose mit Wasser wesentlich höher als mit 15% HOAc)

gibt den Hinweis auf eine organische Säure. Das FAB-Massenspektrum zeigte ein Moleküllion der Masse 438 mu, sowie ein intensives Signal bei M-44 (–CO₂), wie es für eine Carbonsäure zu erwarten ist. Im ¹³C-NMR-Spektrum (vgl. Tab. I) sind 22 Signale vorhanden, davon kann das Signal bei 167,7 ppm dem Kohlenstoffatom der Carbonsäure zugeordnet werden. Weitere 15 Signale sind fast identisch mit dem „rechten“ Luteolinteil von Philonotisflavon, was mit dem Fluoreszenzverhalten und den UV-Spektren in Einklang steht. Die übrigen 6 Signale sind aufgrund der chemischen Verschiebungen einem Benzolring mit zwei orthoständigen Hydroxylgruppen zuzuordnen, der auch die Carboxylgruppe tragen muß. Da die Vermutung nahelag, daß die Verbindung durch Abbau von Philonotisflavon oder 2,3-Dihydrophilonotisflavon entstanden ist, wurden die ¹³C-NMR-Daten mit denen von Protocatechusäure verglichen.



* Publikation Nr. 54 des Arbeitskreises Chemie und Biologie der Moose.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. D. Zinsmeister.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung,
D-W-7400 Tübingen
0939–5075/92/0700–0527 \$ 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 digitalized 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.

Tab. I. ^{13}C -NMR-Daten von Dicranolomin, Philonotisflavon [3], Bartramiasäure (**1**), Luteolin [4] und Protocatechusäure.

Zuordnung	Dicranolomin I („links“)	Dicranolomin II („rechts“)	Philonotisflavon I („links“)	Philonotisflavon II („rechts“)	1	Luteolin	Protocatechusäure
C-2/2''	166,3	163,9	166,5	163,8	163,6	163,9	
C-3/3''	106,2 t	103,3 t	106,4 t	102,4 t	102,1	102,8	
C-4/4''	181,6	181,2	181,7	181,1	182,0	181,6	
C-5/5''	161,2	158,7	161,1	160,3	159,7	161,4	
C-6/6''	98,6 t	107,9	98,6 t	98,3 t	98,4	98,8	
C-7/7''	163,6 t	161,8	163,7	161,4	161,7	164,1	
C-8/8''	93,1 t	93,3 t	93,0 t	103,5	104,8	93,8	
C-9/9''	157,3	156,2	157,2	154,3	154,3	157,2	
C-10/10''	102,8	103,3	102,9	103,2	103,4	103,7	
C-1'/1'''	123,7	120,2	124,0	121,7	121,9	121,5	
C-2'/2'''	119,7	113,3 t	118,7	113,5 t	113,5	113,3	
C-3'/3'''	144,2	145,7	144,3	145,7	145,4	145,7	
C-4'/4'''	148,2	149,6	148,3	149,4	149,3	149,6	
C-5'/5'''	114,3 t	116,0 t	114,6 t	115,5 t	115,5	116,0	
C-6'/6'''	121,5 t	118,9 t	120,5 t	118,9 t	118,4	118,9	
C-1/1''					123,3		121,7*
C-2/2''					120,6		115,1
C-3/3''					143,8		144,8
C-4/4''					148,7		149,9
C-5/5''					113,6		116,5
C-6/6''					122,1		121,8
COOH					167,7		167,2

t = tertiäre Kohlenstoffatome, durch DEPT-Methode bestimmt. Bei gleicher Multiplizität und fast gleicher chemischer Verschiebung können die Zuordnungen innerhalb eines Spektrums vertauscht werden.

* Aufgrund der Signalhöhe kann dieses Signal eindeutig der quartären C-1-Position zugeordnet werden.

Hierbei ist erkennbar, daß sich die chemischen Verschiebungen der Signale von **1** bedingt durch die Verknüpfung in gleicher Weise von Protocatechusäure unterscheiden, wie die B-Ring-Signale des „linken“ Luteolinteils von Philonotisflavon von den entsprechenden Signalen des Luteolins. Diese Befunde sprechen eindeutig dafür, daß es sich bei **1** um Luteolin-8,2''-Protocatechusäure handelt. Die Verbindung wurde Bartramiasäure genannt. Die Kopplungsmuster und die chemischen Verschiebungen des ^1H -NMR-Spektrums (vgl. Tab. II) sind so, wie es für diese Struktur zu erwarten ist.

Bemerkenswert ist, daß die B-Ring-Protonen von **1** im Vergleich zu denjenigen des Luteolins stark hochfeldverschoben sind, wie dies auch bei den entsprechenden B-Ringen von 8''-verknüpften Biflavonoiden zu beobachten ist. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Ebene des mit dem in 8-Position des Luteolins verknüpften Phenylringes der Protocatechusäure aufgrund sterischer Hinderung senkrecht zur Chromonebene steht. Dadurch

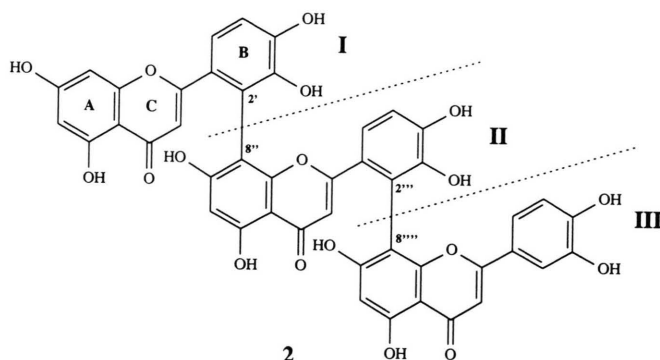
kommen die B-Ring-Protonen in den abschirmenden Bereich dieses Ringes [6]. Ein an C-6 gebundener Aromat kann den B-Ring eines Flavons natürlich nicht auf diese Weise beeinflussen.

Bei der anderen neuen Verbindung **2** lassen die Masse von 854 μu und die UV-Spektren (vgl. Experimentelles) ein Triluteolin vermuten. Dies wird durch 3 verbrückte Hydroxylgruppen im ^1H -NMR-Spektrum bestätigt (vgl. Tab. II). Die Verbindung wurde Bartramia-Triluteolin genannt. Im ^1H -NMR-Spektrum sind zwei *meta*-gekoppelte Protonen, die dem I-A-Ring entsprechen und ein ABX-System vorhanden, das dem III-B-Ring zuzuordnen ist. Die beiden Paare *ortho*-gekoppelter Protonen sind den I-B- und II-B-Ringen zuzuordnen. Durch die *ortho*-Kopplung der I-B- und II-B-Ring-Protonen wird gleichzeitig die Verknüpfung der Luteolinbausteine I und II über die jeweilige 2'- bzw. 2'''-Position eindeutig bewiesen. Aus den verbleibenden 5 Singulets kann die Verknüpfungsstelle am II-A- bzw. III-A-Ring nicht eindeu-

Tab. II: ¹H-NMR-Daten von Protocatechusäure, Luteolin [5], Bartramiasäure (1), Philonotisflavon [3] und Bartramia-Triluteolin (2). In Klammern die Kopplungskonstanten in [Hz].

Zuordnung	Protocatechu- säure	Luteolin	1	Philonotis- flavon I („links“)	Philonotis- flavon II („rechts“)	2 I („links“)	2 II („mitte“)	2 III („rechts“)
I / II / III								
H-3 / 3'' / 3'''	–	6,69 s	6,56 s	6,06 s	6,62 s	6,05 s	6,14 s	6,18 s
H-6 / 6'' / 6'''	–	6,22 d (2)	6,25 s	5,75 d (2)	6,27 s	5,34 d (2)	5,67 s	5,70 s
H-8 / 8'' / 8'''	–	6,47 d (2)	–	6,07 d (2)	–	6,01 d (2)	–	–
OH-5 / 5'' / 5'''	–	13,00 s	12,98 s	12,73 s*	13,01 s*	12,88 s	12,89 s	13,02 s
H-2' / 2'' / 2'''	–	7,43 d (2)	6,98 d (2)	–	7,02 d (2)	–	–	6,64 d (2)
H-5' / 5'' / 5'''	–	6,92 d (8)	6,69 d (8, 5)	7,01 d (8, 5)	6,74 d (9)	6,91 d (8)	6,81 d (8)	6,12 d (8)
H-6' / 6'' / 6'''	–	7,44 dd (8; 2)	6,93 dd (9; 2)	7,24 d (8, 5)	7,00 dd (9; 2)	7,10 d (8)	7,06 d (8)	6,43 dd (8; 2)
H-2	7,32 d (2)	–	–	–	–	–	–	–
H-5 / 5''	6,77 d (8)	–	6,88 d (8, 5)	–	–	–	–	–
H-6 / 6''	7,27 dd (8; 2)	–	7,39 d (8, 5)	–	–	–	–	–

* Diese Werte sind i.c. [3] nicht angegeben, sie wurden dem Originalspektrum entnommen.



tig abgeleitet werden. Da die oben erwähnte Hochfeldverschiebung des B-Ringes durch einen aromatischen Substituenten an C-8 von einem entsprechenden an C-6 nicht ausgehen kann, folgt aufgrund der starken Hochfeldverschiebung der III-B- und II-B-Signale eine Verknüpfung über C-8'' und C-8'''. Obwohl ein vollständiges ¹³C-NMR-Spektrum aufgrund der geringen Substanzmenge nicht zu erhalten war, zeigte ein „DEPT“-Spektrum drei tertiäre Kohlenstoffatome um 98 ppm aber nur eines bei ≈ 93 ppm. Zusammen mit den anderen Befunden beweist dies die angenommene Struktur. Es handelt sich also bei dieser Verbindung (2) um ein 2',8'',2''',8'''-Triluteolin. Bartramia-Triluteolin ist der erste Vertreter einer neuen Flavonoidklasse, der Triflavone. An beiden Inter-

flavonylbindungen ist eine freie Drehbarkeit nicht mehr möglich. Wegen der dadurch bedingten zwei Chiralitätszentren sind für die angegebene Struktur zwei Enantiomerenpaare möglich. Da im ¹H-NMR-Spektrum keinerlei Signalverdopplungen erkennbar sind, ergibt sich, daß nur eines der beiden Diastereomere vorliegt; um welches es sich handelt, konnte aufgrund der geringen Substanzmenge nicht ermittelt werden.

Experimentelles

Das Pflanzenmaterial von *Bartramia pomiformis* Hedw. wurde an zwei verschiedenen Standorten gesammelt: 1. Frankreich, Dép. Haute Rhin, bei Sewen, 57 g, leg. H. Geiger (HG 1397 und

1401); 2. Frankreich, Dép. Haute Saône, bei Corvillers, 143 g, leg. J. P. Frahm (s. nr.).

Belegmaterial befindet sich im Herbarium SAAR. Da die Flavonoidmuster beider Standorte identisch waren, wurde das Pflanzenmaterial vereinigt. Die luftgetrockneten, gereinigten Gametophyten (200 g) wurden sechsmal mit je 2,5 l CHCl_3 entfettet. Anschließend wurden die Flavonoide sechsmal mit je 3 l $\text{EtOH-H}_2\text{O}$ (8:2) extrahiert. Der Eindampfrückstand der EtOH -Extrakte wurde zur Chlorophyllentfernung einer vierstufigen Craig-Verteilung zwischen Ober- und Unterphase von $\text{DMF-H}_2\text{O-Et}_2\text{O}$ (4:1:8) unterworfen. Die vereinigten Unterphasen wurden im Vakuum zu einem dünnen Sirup (ca. 100 ml) eingengt. Nach Zugabe von 60 g trockenem Polyamid-6-Pulver erfolgte eine Verdünnung mit 800 ml H_2O . Die entstandene Suspension wurde auf eine mit H_2O gepackte 2 l Polyamid-6-Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit folgenden $\text{Me}_2\text{CO-H}_2\text{O}$ -Gemischen eluiert: je 4 l (1:4 und 3:7), 12 l (2:3), 8 l (1:1), je 4 l (3:2 und 7:3, sowie 4:1 und 9:1) und 10 l $\text{Me}_2\text{CO-H}_2\text{O-HOAc}$ (8:1:1). Die Substanzen ließen sich in folgender Reihenfolge eluieren: Bartramiaflavon, 2,3-Dihydrophilonotisflavon, Philonotisflavon, Dicranolomin, Anhydrobartramiaflavon zusammen mit Bartramiasäure (**1**) und Bartramia-Triluteolin (**2**), 5',3'''-Dihydroxyamentoflavon. Die weitere Trennung und Aufreinigung erfolgte mit Sephadex LH 20 und $\text{Me}_2\text{CO-MeOH-H}_2\text{O}$ (2:1:1) bzw. $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (8:2).

Ausbeuten: Bartramiaflavon 430 mg; 2,3-Dihydrophilonotisflavon 390 mg; Philonotisflavon 190 mg; Dicranolomin 30 mg; 5',3'''-Dihydroxyamentoflavon 45 mg, Bartramiasäure (**1**) 10 mg und Bartramia-Triluteolin (**2**) 10 mg. **1** und **2** waren ursprünglich noch von einem weiteren labilen Substanzgemisch begleitet, das sich jedoch im Verlauf der weiteren Trennungsschritte zersetzte.

DC: **1** R_f -Werte: 63 (Zellulose/TBA), 45 (Zellulose/ H_2O), 20 (Zellulose/15% HOAc), 52 (Zellu-

lose/40% HOAc), **32** (Polyamid-6/ $\text{EtOAc-MeCOEt-HOAc-H}_2\text{O}$ 5:3:1:1), **36** (Polyamid-6/ $\text{Me}_2\text{CO-H}_2\text{O-HOAc}$ 6:2:2).

2 R_f -Werte: 69 (Zellulose/TBA), 25 (Zellulose/15% HOAc), 60 (Zellulose/40% HOAc), **32** (Polyamid-6/ $\text{EtOAc-MeCOEt-HOAc-H}_2\text{O}$ 5:3:1:1), **28** (Polyamid-6/ $\text{Me}_2\text{CO-H}_2\text{O-HOAc}$ 6:2:2).

Beide Substanzen erscheinen unter UV-Licht (354 nm) dunkel, nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A gelb.

UV-Spektroskopie [7]: **1**: MeOH 255–274 sh–294–346; NaOMe 271–404; AlCl_3 276–308 sh–335 sh–429; $\text{AlCl}_3\text{-HCl}$ 261 sh–279 sh–297 sh–357–393 sh; NaOAc 268–347; NaOAc– H_3BO_3 232–262–301 sh–372.

2: MeOH 225 sh–256–346; NaOMe 225 sh–270–329 sh–398; AlCl_3 273–301 sh–410; $\text{AlCl}_3\text{-HCl}$ 263–307 sh–350–397 sh; NaOAc 258 sh–348; NaOAc– H_3BO_3 260–368.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie: Bruker AM 400, 400 MHz, DMSO-d_6 , Raumtemperatur.

$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie: Bruker AM 400, 100 MHz, DMSO-d_6 , Raumtemperatur.

Die Massenspektren wurden mit FAB-Technik (Negativ-Modus) an einem Finnigan MAT 90 in einer Glycerin-Methanol-Matrix mit 4–8 keV Xenon-Atomen aufgenommen.

Dank

Wir danken Frau Dr. M. Walter und Herrn Dr. R. Graf für die Aufnahme der FAB-Massenspektren, Frau M. Jung und Herrn Dipl.-Chem. J. Zapp für die Aufnahme der NMR-Spektren (alle Universität des Saarlandes). Herrn Prof. Dr. J.-P. Frahm wird für das Sammeln von Pflanzenmaterial herzlich gedankt. Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie sowie der BASF, Ludwigshafen, sind wir für finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.

- [1] T. Seeger, H. Geiger und H. D. Zinsmeister, *Phytochemistry* **30**, 1653–1656 (1991).
- [2] T. Seeger, Biflavonoide und strukturverwandte Verbindungen aus Laubmoosen unter besonderer Berücksichtigung der Bartramiaceae, Dissertation, Saarbrücken 1992.
- [3] H. Geiger und M. Bokel, *Z. Naturforsch.* **44c**, 559–562 (1989).
- [4] H. Geiger, S. Anhut und H. D. Zinsmeister, *Z. Naturforsch.* **43c**, 1–4 (1988).

- [5] H. Geiger, W. Stein, R. Mues und H. D. Zinsmeister, *Z. Naturforsch.* **42c**, 863–867 (1987).
- [6] K. R. Markham und H. Geiger, ^1H NMR spectroscopy of flavonoids and their glycosides in Hexadeuterodimethylsulphoxide, in: *The Flavonoids – Advances in research 1986–1990* – (J. B. Harborne, ed.), Chapman und Hall, im Druck.
- [7] T. J. Mabry, K. R. Markham und M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, Berlin 1970.