

Inhaltsstoffe von Fagaceae (Cupuliferae), 19. Mitt.¹⁾:**Triterpensaponine und Acylflavonoide aus *Quercus robur* var. *stenocarpa* Beck.**

Giovanni Romussi* und Brunella Parodi

Istituto di Analisi e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari dell'Università di Genova, via Brigata Salerno, I-16147, Genova, Italien

Cosimo Pizza und Nunziatina De Tommasi

Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Università di Napoli, Via D. Montesano 49, I-80131 Napoli, Italien

Eingegangen am 5. Januar 1994

Constituents of Fagaceae (Cupuliferae), XIX¹⁾: Triterpene Saponins and Acylated Flavonoids from *Quercus robur* L. var. *stenocarpa* Beck.

Aus den Blättern von *Quercus robur* L. var. *stenocarpa* Beck. wurde neben vier bekannten Glycosiden ein neues Triterpensaponin isoliert und als 28- β -D-Glucopyranosylester der 2 α ,3 β ,19 α -Trihydroxy-12-oleanen-24,28-dicarbonsäure (**1**) identifiziert.

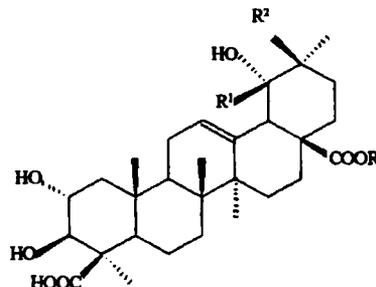
In addition to four known glycosides from leaves of *Quercus robur* L. var. *stenocarpa* Beck. a new triterpene saponin has been isolated and identified as 28- β -D-glucopyranosyl ester of the 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-oleanene-24,28-dioic acid (**1**).

In Fortsetzung unserer Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Fagaceen (Cupuliferen)¹⁾ untersuchten wir *Quercus robur* L. var. *stenocarpa* Beck.

Quercus robur L. und *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl. wurden schon im Altertum medizinisch verwendet. Offizinell ist die Rinde (*Cortex Quercus*, 2.AB DDR, ÖAB, Ph.Helv.VI), die Gerbstoffe mit adstringierender und blutstillender Wirkung enthält²⁾. Aus *Quercus robur* L. (syn. *Quercus pedunculata* Ehrh.) wurden früher verschiedene nicht-acylierte Flavonoidglycoside isoliert³⁾.

Aus dem ethanolischen Extrakt der Blätter von *Quercus robur* L. var. *stenocarpa* Beck. isolierten wir zwei Triterpensaponine **1** und **2** und drei acylierte Flavonoidglycoside **3**, **4**, **5**.

Sechs quartäre Kohlenstoffatome und zwei olefinische Signale bei $\delta = 124.9$ und 144.4 ppm im ¹³C-NMR-Spektrum von **1** (Tab. 2) wiesen auf eine 12-Oleanen-Struktur hin⁴⁾. Die saure Totalhydrolyse, die Glucose liefert, ein "Quasi-Molekülion" (M - H)⁻ bei m/z = 679 bzw. ein Fragmention bei m/z = 517 [(M - H) - 162]⁻ (679-Glucose) im negativen FAB-MS, sechs Signale im ¹³C-NMR-Spektrum, die für esterartig gebundene Glucose typisch sind⁵⁾; zwei CO-Signale bei $\delta = 180.8$ und 177.2 ppm⁵⁾; zwei IR-Banden bei 1698 und 1720 cm⁻¹⁶⁾, die für eine freie bzw. veresterte Carboxylgruppe charakteristisch sind, und die Kopplungskonstante des anomeren Protons der Glucose (J = 7.8 Hz) im ¹H-NMR-Spektrum (Tab. 1) zeigen, daß es sich bei **1** um ein Mono- β -D-Glucopyranosylester einer Trihydroxy-12-oleanen-dicarbonsäure handelt. Das ist in Einklang mit der Spaltbarkeit des Saponins **1** durch alkalische Hydrolyse,



	R ¹	R ²	R ³
1	H	CH ₃	β -D-Glucopyranosyl
1a	H	CH ₃	H
2	CH ₃	H	β -D-Glucopyranosyl
2a	CH ₃	H	H

Schema 1

die zum Aglykon **1a** führt. Die Anwesenheit von Resonanzsignalen in den ¹³C-NMR-Spektren von **1** und **1a**, deren chemische Verschiebungen mit denen der C-Atome der Ringe A, B der 2 α ,3 β ,19 α -Trihydroxy-12-ursen-24,28-dicarbonsäure⁷⁾ bzw. der Ringe C, D, E von 19-Hydroxy-12-oleanen-28-carbonsäuren⁸⁾ eng korrelierbar sind, beweist eine identische Partialstruktur in **1** und **1a**. Auf-

Tab. 1: ¹H-NMR-Daten von **1**, **1a**, **2**, **2a** in [D₅]Pyridin bei 500 MHz; δ-Werte (J in Hz)

H	1	1a	2	2a
2	4.75	4.75	4.74	4.74
3	ddd(13.5,9.5,5.0)	dt(10.2,4.7)	dt(10.2,4.5)	dt(10.1,4.8)
12	3.37 d(10.2)	3.40 d(9.8)	3.38 d(10.3)	3.38 d(10.0)
18	5.45 brs	5.55 brs	5.54 brs	5.59 brs
19	3.49brs	3.60 brs ^{a)}	2.91 s	3.03 s
1'Gl.	3.56 m	3.60 brs ^{a)}	-	-
	6.32 d(7.8)	-	6.26 d(8.0)	-

CH₃-Signale:

1	1.74, 1.60, 1.22, 1.20, 1.11, 0.94
1a	1.78, 1.65, 1.22, 1.19, 1.10(x2)
2	1.76, 1.68, 1.39, 1.24(x2), 1.05(d, J=6.9 Hz, 30-CH ₃)
2a	1.76, 1.73, 1.43, 1.21, 1.14, 1.10(d, J=6.8 Hz, 30-CH ₃)

^{a)} Die 18-H- und 19-H-Signale überlappen und erscheinen als breites Singulett (2H).

Tab. 2: ¹³C-NMR-Daten von **1**, **1a**, **2** in [D₅]Pyridin bei 125 Hz; δ-Werte

C	1	1a	2	DEPT ^{a)}
1	48.0	48.0	48.8	CH ₂
2	68.6	68.5	68.8	CH
3	84.4	84.3	84.4	CH
4	50.2	50.1	50.1	C
5	57.1	56.9	57.1	CH
6	21.2	21.0	21.2	CH ₂
7	33.5	33.6	33.9	CH ₂
8	40.3	40.0	40.7	C
9	48.1	47.9	47.4	CH
10	39.2	39.0	39.1	C
11	24.7	24.4	25.2	CH ₂
12	124.9	123.5	128.7	CH
13	144.4	144.8	139.4	C
14	42.3	42.3	42.3	C
15	29.1	29.3	29.3	CH ₂
16	28.1	28.5	26.3	CH ₂
17	46.6	46.1	48.7	C
18	44.8	44.9	54.6	CH
19	81.1	81.2	72.7	CH(1,1a);C(2)
20	35.7	35.7	42.4	C(1,1a);CH(2)
21	29.0	29.1	27.1	CH ₂
22	33.1	33.6	37.8	CH ₂
23	25.2	25.1	25.2	CH ₃
24	180.8	180.6	181.1	C
25	15.2	15.1	15.5	CH ₃
26	17.6	17.4	17.5	CH ₃
27	24.5	24.7	24.6	CH ₃
28	177.2	180.9	177.3	C
29	28.9	28.8	26.8	CH ₃
30	24.8	24.8	16.9	CH ₃
1'Gl	95.9	-	95.9	CH
2'	74.2	-	74.1	CH
3'	79.0	-	79.0	CH
4'	71.1	-	71.3	CH
5'	79.5	-	79.4	CH
6'	62.2	-	62.3	CH ₂

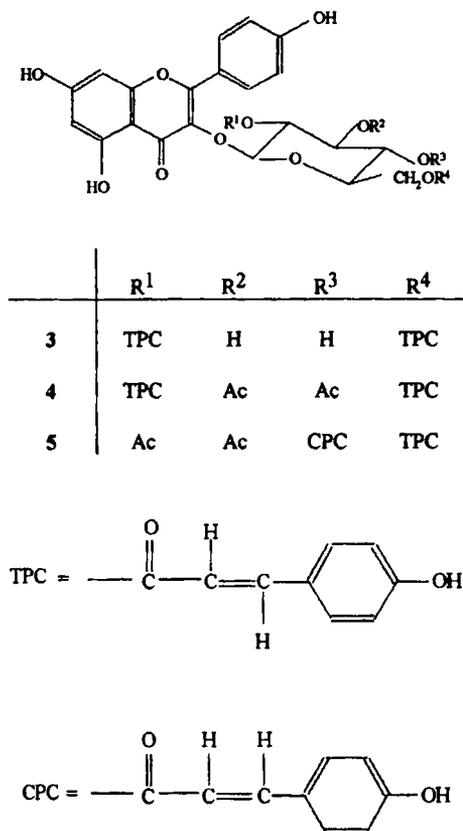
^{a)} Die DEPT-Experimente wurden wie beschrieben¹⁵⁾ durchgeführt.

grund dieser Ergebnisse wird das Aglykon **1a** als 2α,3β,19α-Trihydroxy-12-oleanen-24,28-dicarbonsäure (Bartogensäure⁹⁾) identifiziert. Ein Vergleich der Protonensignale im ¹H-NMR-Spektrum von **1** mit denen von **1a** ergibt deutliche Tieffeldverschiebungen (Δδ = +0.10 ppm bzw. +0.11 ppm) für die 12-H- bzw. 18-H-Signale des Aglykons. Dieser Befund⁷⁾ ist nur so zu interpretieren, daß die Glucose an die 28-Carboxylgruppe gebunden ist. **1** ist also der 28-β-D-Glucopyranosylester der 2α,3β,19α-Trihydroxy-12-oleanen-24,28-dicarbonsäure.

Fünf quartäre C-Atome und zwei olefinische Signale bei 128.7 und 139.4 ppm im ¹³C-NMR-Spektrum von **2** weisen auf eine 12-Ursen-Struktur hin⁴⁾. Saure Totalhydrolyse, die Glucose liefert, ein "Quasimolekülion" (M⁻H⁺) bei m/z = 679 bzw. ein Fragmention bei m/z = 517 im negativen FAB-MS, zwei CO-Signale bei δ = 181.1 und 177.3 im ¹³C-NMR-Spektrum, zwei IR-Banden bei 1712 und 1689 cm⁻¹, Spaltbarkeit des Saponins durch alkalische Hydrolyse, ein ¹³C-NMR-Spektrum, dessen chemische Verschiebungen mit denjenigen des Trachelosperoside A-1 eng korrelierbar sind⁷⁾, eine deutliche Tieffeldverschiebung (Δδ = +0.12 ppm) für das 18-H-Signal im ¹H-NMR-Spektrum des Aglykons⁷⁾ **2a** im Vergleich mit demjenigen des Saponins zeigen, daß **2** der 28-β-D-Glucopyranosylester der 2α,3β,19α-Trihydroxy-12-ursen-24,28-dicarbonsäure (Trachelosperoside A-1) ist.

Bei direktem Vergleich mit von uns aus anderen *Quercus*-Arten isolierten Testsubstanzen (UV, IR, DC) erwiesen sich **3** mit Kämpferol-3-O-[2,6-di-O-(trans-p-cumaroyl)-β-D-glucopyranosid], **4** mit Kämpferol-3-O-[3,4-di-O-acetyl-2,6-di-O-(trans-p-cumaroyl)-β-D-glucopyranosid] und **5** mit Kämpferol-3-O-[2,3-di-O-acetyl-4-O-(cis-p-cumaroyl)-6-O-(trans-p-cumaroyl)-β-D-glucopyranosid] als identisch¹⁰⁾.

1 wurde bisher noch nicht beschrieben, **1a** wurde nur in *Barringtonia speciosa* Forst, *Barringtonia acutangula* Gaert. (Myrtaceae)^{9,11)} und *Vochysia vismiaefolia* Spruce ex



Schema 2

Warm (Vochysiaceae)¹² und **2** nur in *Trachelospermum asiaticum* Nakai (Apocynaceae) gefunden. Die Flavonoide **3-5** wurden bisher nur aus *Quercus*-Arten isoliert¹⁰. Für **3** wurde eine topische antiphlogistische Wirkung beschrieben¹³.

Dem botanischen Garten der Universität Genua danken wir für die Blätter von *Quercus robur* L. var. *stenocarpa* Beck, Prof. G. Sindona und A. Napoli, Università della Calabria (Italien) für die FAB-MS und dem italienischen "Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica" für die finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

¹H- und ¹³C-NMR-Spektren: Bruker-Spektrometer AMX-500, [D₅] Pyridin, TMS als int. Standard.- IR-Spektren: Perkin-Elmer 1310.- UV-Spektren: Perkin-Elmer Lambda 3.- DCCC: Büchi 670 DCC-Chromatograph; 294 Trennröhrchen (2.7 x 400 mm); Methanol/Chloroform/Wasser, 13:7:8 (weniger polare Phase als mobile Phase, absteigende Methode, 0.5 ml/min., 60 ml-Fractionen).- HPLC: Perkin-elmer Series 4 Liquid Chromatograph mit LCI-100 Integrator und LC-85B Detector bei 206 nm; Waters RP-18 Bondapak TM (7.8 x 300 mm, 10 μ)-Säule; Methanol/Wasser 7:3 als Elutionsmittel, 1.5 ml/min.- Negativ FAB-MS: Vacuum Generators ZAB-2F; Glycerin, Xe bei 8 KeV.- DC: DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Fa. Merck). Fließmittel: Essigester/Ameisensäure, 10:0.5. Sprühreagenz: 50proz. H₂SO₄, 5 min auf 110°C.- [α]: Polarimeter Perkin-Elmer 241.

Isolierung

Die Blätter von *Quercus robur* L. var. *stenocarpa* Beck. wurden im botanischen Garten "Thomas Hanbury" der Universität Genua gesammelt,

bei Raumtemp. getrocknet (1.2 Kg) und mit Ethanol extrahiert. Nach Eindampfen des Extraktes i.Vak. wurde der Rückstand mit CCl₄ gewaschen und dann mit Wasser/n-Butanol aufgenommen. Die n-Butanol-Lösung wurde eingengt und der Rückstand mit Wasser/Ether versetzt. Die eingedampfte org. Phase (15 g) diente für die Isolierung und Identifizierung der Flavonoidverbindungen mit beschriebenen Methoden^{10,14}. Die Ausb. der rohen Verbindungen **3**, **4** und **5** war: 10 mg, 150 mg und 15 mg.- Die wäßrige Phase wurde eingengt, der Rückstand (40 g) portionsweise (8 g) an einer Sephadex LH 20-Säule (48 x 5 cm) mit Methanol als Elutionsmittel chromatographiert, und die einzelnen Fraktionen (60 ml) wurden dc untersucht. Die Fraktionen, die **1** und **2** im Gemisch mit Begleitstoffen enthielten, wurden eingedampft, und der Rückstand (4 g) wurde mit DCC-Chromatographie aufgearbeitet. Man erhielt Fraktionen, die **1** und **2** zusammen enthielten, aus denen beim Einengen Mischkristalle der zwei Saponine (winzige Nadeln, 1 g) kristallisierten. Die Feintrennung erfolgte durch wiederholte HPLC von etwa 10 mg Gemisch. Aus je 300 mg Mischkristallen erhielt man 120 mg **1** bzw. 110 mg **2**, die aus Methanol/Wasser umkristallisiert wurden. **1**: winzige Nadeln, Schmp.: Zers. oberhalb 230°C.- [α]_D²⁰ = +17.1 (c = 1.0 in CH₃OH).- IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3440 br (OH); 1720 (COOR); 1698 (COOH).- ¹H- und ¹³C-NMR: s. Tab. 1 und 2.- Neg. FAB-MS (8 KeV): m/z = 679 (M - H); 517 [(M - H) - 162] (Glucoseverlust). **2**: winzige Nadeln, Schmp.: Zers. oberhalb 220°C.- IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3470 br (OH); 1712 (COOR); 1689 (COOH).- ¹H- und ¹³C-NMR: s. Tab. 1 und 2.- Neg. FAB-MS (8 KeV): m/z = 679 (M - H); 517 [(M - H) - 162] (Glucoseverlust).

Alkalische Hydrolyse von **1** und **2**

30 mg **1** bzw. **2** wurden mit 2 ml N NaOH auf dem Wasserbad 10 min erhitzt. Das Hydrolysat wurde mit Ionenaustauscher Amberlite IR-120 (H⁺-Form) neutralisiert, eingedampft und aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausb. 20 mg **1a** bzw. **2a**.

1a: IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3440 br (OH); 1690 (COOH).- ¹H- und ¹³C-NMR: s. Tab. 1 und 2.

2a: IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3430 br (OH); 1689 (COOH).- ¹H-NMR: s. Tab. 1.

Die saure Totalhydrolyse bzw. die Identifizierung der Glucose wurden wie beschrieben durchgeführt⁶.

Literatur

18. Mitt.: G. Romussi, F. Lucchesini, *Pharmazie* **1993**, *48*, 227-228.
- B. Zepernick, L. Langhammer, J.B.P. Lüdcke, *Lexicon der offiziellen Arzneipflanzen*, S. 339-341, Walter de Gruyter, Berlin, **1984**.
- M. Tissut, K. Egger, *Phytochemistry* **1972**, *11*, 631-634.
- D.M. Doddrell, P.W. Khong, K.G. Lewis, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 2381-2384.
- G. Romussi, G. Bignardi, G. Falsone, D. Wendisch, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1987**, *320*, 153-158.
- G. Romussi, G. Ciarallo, G. Falsone, C. Schneider, *Liebigs Ann. Chem.* **1979**, 2028-2035.
- F. Abe, T. Yamauchi, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1748-1754.
- F. Abe, T. Yamauchi, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1833-1838.
- G.S.R. Subba Rao, S. Prasanna, V.P. Sashi Kumar, G.R. Mallavarapu, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 333-334.
- G. Romussi, G. Bignardi, C. Pizza, N. De Tommasi, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1991**, *324*, 519-524.
- G.S.R. Subba Rao, S. Prasanna, V.P. Sashi Kumar, B. Yadagiri, *Ind. J. Chem. Sect. B* **1986**, *25B*, 113-122.
- W.L.F. Araujo, P.M. Souza, R. Braz Filho, *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1436-1440.
- A. Tubaro, P. Del Negro, P. Bianchi, G. Romussi, R. Della Loggia, *Agents Actions* **1989**, *26*, 229-230.
- G. Romussi, G. Ciarallo, B. Parodi, *Pharmazie* **1988**, *43*, 294-295.
- C. Pizza, Z. Zhong-Liang, N. De Tommasi, *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 927-931. [Ph211]