

Neolicucurosid - ein neues Chalkonglykosid aus der Süßholzwurzel

Holger Miething und Annette Speicher-Brinker

Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin, Königin-Luise-Str. 2+4, D-1000 Berlin 33

Eingegangen am 24. Juni 1988

Das zuerst von Litvinenko aus *Liquiritiae radix*¹⁾ isolierte Licucurosid (1) ist keine einheitliche Verbindung. Sie kann mit Hilfe moderner Chromatographieverfahren (HPLC, LPLC) in zwei isomere Glykoside 1 und 2 getrennt werden. Bei 2 handelt es sich um das bisher nicht beschriebene Isoliquiritigenin-4- β -D-apiofuranosyl-2''- β -D-glukopyranosid, für das der Name Neolicucurosid vorgeschlagen wird. Für 1 kann die Konstitution als Isoliquiritigenin-4'- β -D-apiofuranosyl-2''- β -D-glukopyranosid durch Spektroskopie gesichert werden.

Neolicucuroside - a New Chalcone Glycoside from the Roots of *Glycyrrhiza glabra*

Licucuroside (1), first isolated by Litvinenko from the roots of *Glycyrrhiza glabra*¹⁾, is not a homogenous compound. It is separated into two isomeric glycosides 1 and 2 using modern chromatographic techniques (HPLC, LPLC). The structure of 2 is confirmed as isoliquiritigenin-4- β -D-apiofuranosyl-2''- β -D-glucopyranoside. So far 2 has not been described. The name neolicucuroside is proposed. The structure of 1 is established as isoliquiritigenin-4'- β -D-apiofuranosyl-2''- β -D-glucopyranoside by spectroscopic methods.

Die Chalon-Flavanonfraktion wird für die spasmolytische Wirkung der Süßholzwurzel verantwortlich gemacht²⁾. Eine Nachuntersuchung der Droge mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Abb. 1) zeigt – nach systematischer Variation der Eluentenzusammensetzung –, daß das ursprünglich als einheitlich angesehene Chalkondiglykosid Licucurosid (1) aus zwei Verbindungen 1 und 2 besteht. Die Isolierung von 1 und 2 aus einem Rohextrakt (MeOH/Wasser 1:1) gelingt nach sc Anreicherung an Polyamid und anschließender Reindarstellung mittels Niederdruckchromatographie (LPLC) an einer Reversed-phase-Säule (Lobar^R Fa. Merck, RP-8).

Die beiden Glykoside unterscheiden sich deutlich in ihren Schmelzpunkten (1=180°C; 2=148°C). Sie zeigen beide im FAB⁻-Massenspektrum als höchstregistriertes Ion ein Signal bei $m/z=549$ ($[M-H]^+$) und liefern nach Hydrolyse (s. exp. Teil) neben Isoliquiritigenin (s. Formelbilder) identische Zucker (Glukose und Apiose). Die Zucker liegen jeweils als Diglykosid vor; dies ergibt sich aus den Fragmentierungen im FAB⁻-Massenspektrum: Aus dem Molekülion bei $m/z=549$ ($[M-H]^+$) wird zunächst das einer Pentose minus H₂O entsprechende Bruchstück eliminiert (m/z 417 = $[M-Apiose]^+$), anschließend wird ein einer Hexose minus H₂O entsprechendes Fragment abgespalten (m/z 255 = $[M-Apiose-Glukose]^+$). Da die Drehwerte von 1 und 2 innerhalb der Fehlergrenzen gleich sind, kann vermutet werden, daß die Verknüpfungen der Zucker D-Glukose und Apiose identisch sind. Diese Annahmen werden gesichert durch die ¹³C-NMR-Spektroskopie. Die Verknüpfung der Apiose am C-2 der Glukose ergibt sich aus der Tieffeldverschiebung des C-2-Signals von 73.3 ppm bei unsubstituierter Glukose nach 75.7 bzw. 75.8 bei 1 und 2. Analoge Signallagen werden für Apiin (=Apigenin-D-apiofuranosyl-2'- β -D-glukopyranosid)³⁾ sowie für Liquiritigenin-4'-D-apiofuranosyl-2''- β -D-glukopyranosid⁴⁾ angegeben [vgl. auch ⁵⁾]. 1 und 2 können

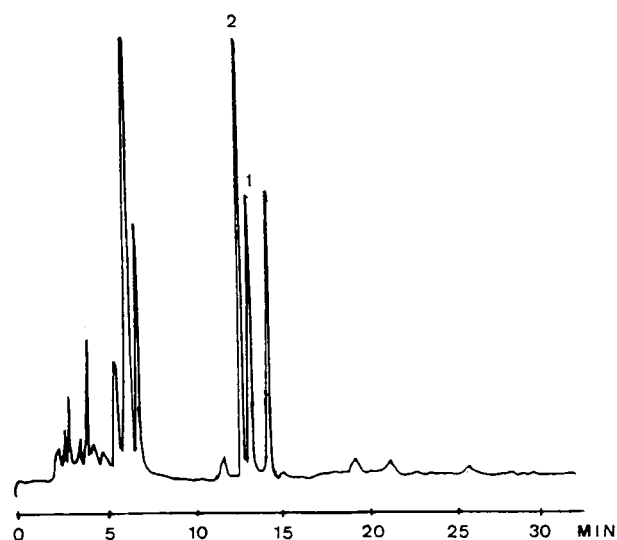
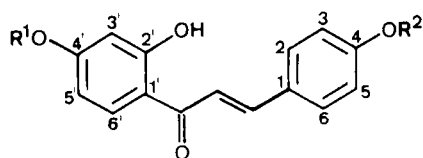


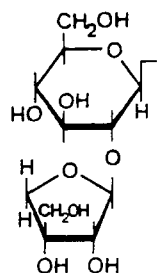
Abb. 1: HPL-Chromatogramm eines methanolischen Drogengesamt-auszugs von *Liquiritiae radix* (Drogenprovenienz Türkei 1983) (Fließmittelsystem: Stufengradient s.u.; Detektion: 274 nm für Flavane, 368 nm für Chalkone)

Elution	Acetonitril : H ₂ O/H ₃ PO ₄	Detektion UV nm
0-12 Min	23 : 77/0.6	274
12-18 Min	30 : 70/0.6	368
18-23 Min	40 : 60/0.6	274
23-26 Min	40 : 60/0.6	368

sich somit lediglich durch die Glykosidierungsposition am Aglykon, das sind die Positionen 2'-OH, 4'-OH oder 4-OH, unterscheiden. Position 2'-OH ist in beiden Fällen frei. Das aufgrund der Chelatisierung mit der benachbarten Carbonylfunktion stets tieffeldverschobene Signal für das Hydroxylproton an C-2' findet sich sowohl im ¹H-NMR-



	R ¹	R ²
1	β-D-Api(1→2)-β-D-Glc	H
2	H	β-D-Api(1→2)-β-D-Glc
3	H	β-D-Glc
4	H	H



β-D-Api(1→2)-β-D-Glc

Spektrum von 1 bei δ ppm = 13.53 als auch in dem von 2 bei δ ppm = 13.50. Durch Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von 1 und 2 mit dem Spektrum des in seiner Konstitution gesicherten Isoliquiritigenin-4-β-D-glukopyranosids (3)⁶ sowie mit dem des Isoliquiritigenins (4) kommt für 1 die 4'-OH Position in Frage. Die Glukosidierung des Isoliquiritigenins in 4-Position führt zu Tieffeldverschiebungen sowohl der ortho- als auch der metaständigen Protonen: ortho H-3/5 + Δ 0.26 ppm, meta H-2/6 + Δ 0.12 ppm. Die Resonanzlagen der Protonen des B-Rings (H-2,3,5,6) von 1 stimmen vollständig mit denen des Isoliquiritigenins überein. Hingegen zeigen sich die für eine Glykosidierung in 4'-Position zu erwartenden Tieffeldverschiebungen der benachbarten Protonen: ortho H-5' + Δ 0.18 ppm, ortho H-3' + Δ 0.27 ppm, meta H-6' + Δ 0.12 ppm. Für 2 folgt daraus die 4-OH Position als Glykosidierungsstelle. Alle Protonenresonanzen der Aglykonkomponente von 2 stimmen mit denen des Isoliquiritigenin-4-β-D-glukosids überein. Die hiermit festgelegten Strukturen von 1 und 2 können unabhängig durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie gesichert werden. Nach Markham et al.⁷ führen Glykosidierungen im Fall von Flavanonen als Aglykonkomponenten zu charakteristischen Veränderungen der ^{13}C -chemischen Verschiebungen der ortho- und para-Kohlenstoffe sowie desjenigen der Glykosidierungsposition, verglichen mit dem jeweiligen Aglykon. Analoge Verschiebungen finden Yahara et al.⁸ beim Flavanonglukosid Liquiritigenin-4',7-diglukosid. In Tab. 1 sind die entspr. Veränderungen der ^{13}C -chemischen Verschiebungen (Δ ppm-Werte) von 1 und 2 im Vergleich zu deren Aglykon Isoliquiritigenin mit den Literaturdaten zusammengestellt.

Experimenteller Teil

Schmp.: Kofler-Heizmikroskop, unkorrt. - Opt. Drehung: Polarimeter 141 Perkin-Elmer. - UV: Zeiss Spektralphotometer PM Q II. - ^1H -NMR: Bruker

Tab. 1 Gegenüberstellung der durch Glykosidierung erfolgten Veränderungen (Δ ppm) der ^{13}C -chemischen Verschiebungen in ortho (C-3/5 bzw. C-3'/5') und para (C-1 bzw. C-1') Position zur Glykosidierungsstelle, sowie des Glykosidierungskohlenstoffs (C-4 bzw. C-4')

1 (ppm)	Isoliquiritigenin (ppm) Lit. ⁶⁾	Δ ppm gefunden	Δ ppm für Flavanonglyk. Lit. ⁷⁾ (*)	Lit. ⁸⁾ (**)
C-4'	163.3	- 2.1	- 1.4	- 1.2
C-3'	103.4	+ 0.8	+ 0.5 bis 0.9	+ 0.9
C-5'	108.0	+ 0.1	+ 0.7 bis 0.9	+ 0.4
C-1'	114.8	+ 1.6	+ 1.6	+ 1.7
2 (ppm)				
C-4	159.2	- 0.7	- 1.4	- 0.8
C-3	116.3	+ 0.5	+ 0.5 bis 0.9	+ 1.0
C-5	116.3	+ 0.5	+ 0.7 bis 0.9	+ 1.0
C-1	128.4	+ 2.6	+ 1.6	+ 2.7

(*) Naringenin-7-neohesperidosid, Hesperitin-7-rutinosid

(**) Liquiritigenin-4',7-diglukosid

WM 250 (250 MHz). - ^{13}C -NMR: Bruker WM 250 (62.89 MHz). - MS: Varian MAT CH-7A (EI-MS) und Varian MAT CH-5DF (FAB-MS). - Mitteldruck-SC: Lobar^R-Fertigsäulen, LiChroprep RP-8 (Größe C, Fa. Merck). - DC: Kieselgel-Fertigfolien-F₂₅₄, Merck. - HPLC: Pumpe und UV-Detektor Fa. Knauer; Säule: Lichrosorb RP-18, 7 μm , 250 mm; Flußrate: 2 ml/min; Empfindlichkeit: 0.64; Schreibergeschwindigkeit: 0.5 cm/min.

Isolierung von 1 und 2

40 g Extractum Liquiritiae ex rad. sicc. (Fa. Birkenweg) werden in 100 ml Wasser gelöst. Die Zucker werden sc (Ø 10 cm, Länge 110 cm) an 320 g Polyamid (Divergan^R) mit 2.5 l Wasser entfernt. Durch Elution mit Wasser:MeOH (95/5 → 85/15) wird die Fraktion der Chalkon-Flavanoglykoside erhalten. Die Reindarstellung von 1 und 2 erfolgt sc an RP-8 (Lobar-Fertigsäule, Größe C) mit Wasser:Acetonitril (90/10) in Fraktionen zu 20 ml (Flußrate 20 ml/15 min): Fraktion 1-24 → 220 mg 2, 25-34 → 313 mg 1. Die erhaltenen Fraktionen werden mit dem angegebenen HPLC-System (Abb. 1) überprüft. Anschließend Umkristallisieren aus Ethanol.

Licurosid (Isoliquiritigenin-4'-D-apiofuranosyl-2''-β-D-glukopyranosid, 1)

290 mg gelbe Kristalle (EtOH), Schmp. 180 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -96.5^\circ$ (Ethanol, c = 1.10). - C₂₆H₃₀O₁₃ (MG 550). - UV (Methanol): λ_{max} (log ϵ): 242 (4.58), 368 nm (4.60). - ^1H -NMR (250 MHz/DMSO-d₆/TMS/ δ ppm/Glukosyl- und Apiosyl-H in DMSO-d₆/CF₃COOD): 8.29 (d, 1H, J=8.9 Hz, H-6'), 7.84 (d, 1H, J=15.0 Hz, β -H), 7.79 (d, 2H, J=8.6 Hz, H-2,6), 7.76 (d, 1H, J=15.0 Hz, α -H), 6.85 (d, 2H, J=8.6 Hz, H-3/5), 6.60 (d, 1H, J=2.3 Hz, H-3'), 6.56 (dd, 1H, J=8.9/2.3 Hz, H-5'), 5.35 (s br, 1H, H-1'' Apiose), 5.13 (d, 1H, J=7.2 Hz, H-1'' Glukose), 3.0 - 4.0 (m, 11H, Glykosyl-H). - ^{13}C -NMR (62.89 MHz/DMSO/TMS/ δ ppm/G=Glukose-C, A=Apiose-C): 192.1 (C=O), 165.1 (C-2'), 163.3 (C-4'), 160.4 (C-4), 144.9 (β -C), 132.4 (C-6'), 131.3 (C-2/6), 125.6 (C-1), 117.4 (α -C), 115.8 (C-3/5), 114.8 (C-1'), 108.7 (A-1), 108.0 (C-5'), 103.4 (C-3'), 98.0 (G-1), 79.2 (A-3), 77.0 (G-5), 76.7 (A-2), 76.0 (G-3), 75.8 (G-2), 73.9 (A-5), 69.8 (G-4), 64.2 (A-4), 60.5 (G-6). - EI-MS (80 eV, 220 °C, m/z (rel. Int.)): 256 (100), 239 (12), 163 (20), 150 (13), 137 (67), 120 (37); NI-FAB-MS (Xenon, 10⁻⁵ Torr, DMSO/Glycerin, m/z): 549 [M-H]⁻, 417 [C₂₁H₂₁O₉, M-Apiose]⁻, 255 [C₁₅H₁₁O₄, M-Apiose-Glukose]⁻.

*Neolicurosid**(Isoliquiritigenin-4-D-apiofuranosyl-2''-β-D-glukopyranosid 2)*

212 mg gelbe Kristalle (EtOH), Schmp. 148 °C, $[\alpha]_D^{20} = -98.8$ (Ethanol, $c = 1.19$). – $C_{26}H_{30}O_{13}$ (MG 550). – UV (Methanol): λ_{max} (log ϵ): 240 (3.12), 364 nm (4.30). – 1H -NMR (250 MHz/DMSO- d_6 /TMS/ δ ppm/Glukosyl- und Apiosyl-H in DMSO- d_6 /CF₃COOD): 8.21 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-6'), 7.89 (d, 1H, $J = 15.3$ Hz, β-H), 7.88 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H-2/6), 7.78 (d, 1H, $J = 15.3$ Hz, α-H), 7.10 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H-3/5), 6.42 (dd, 1H, $J = 8.9/2.3$ Hz, H-5'), 6.29 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-3'), 5.35 (s br, 1H, H-1'' Apiose), 4.98 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, H-1'' Glukose), 3.0 – 4.0 (m, 11H, Glykosyl-H). – ^{13}C -NMR (62.89 MHz/DMSO/TMS/ δ ppm/G=Glukose-C, A=Apiose-C): 191.4 (C=O), 165.8 (C-4'), 165.2 (C-2'), 159.2 (C-4), 143.4 (β-C), 132.9 (C-6'), 130.7 (C-2/6), 128.4 (C-1), 119.1 (α-C), 116.3 (C-3/5), 112.9 (C-1'), 108.6 (A-1), 108.2 (C-5'), 102.5 (C-3'), 98.3 (G-1), 79.2 (A-3), 76.9 (G-5/A-2), 76.0 (G-3), 75.7 (G-2), 73.9 (A-5), 69.9 (G-4), 64.3 (A-4), 60.5 (G-6) – EI-MS und FAB⁺-MS identisch mit 1. Bezüglich der anomeren Konfiguration des Apioseanteils vgl. Lit.⁴⁾.

Hydrolysebefunde

Je 10 mg 1 bzw. 2 werden in 10 ml MeOH/H₂O (1:1) gelöst und mit 2 ml N HCl 2 h im Wasserbad bei 70 °C erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.Vak. wird der Rückstand zwischen EtOAc und H₂O verteilt. Die EtOAc-Phasen enthalten jeweils Isoliquiritigenin und das korrespondierende Flavanon Liquiritigenin (Rf-Werte 0.77 bzw. 0.74; FM: CHCl₃: MeOH:H₂O 50:50:25 Unterphase; Detektion: Anisaldehyd/H₂SO₄-

Reagenz). Die Wasserphasen enthalten jeweils Glukose und Apiose (Rf-Werte: 0.28 Glukose, 0.48 Apiose; FM: EtOAc:H₂O:MeOH:CH₃COOH 65:15:15:20; Detektion: Thymol/H₂SO₄-Reagenz).

Herstellung der HPLC-Untersuchungslösung: 10 g gepulverte Wurzel Droge (Fa. Birkenweg, Kleinostheim) werden mit 100 ml MeOH bei 50 °C extrahiert. Nach dem Filtrieren wird der Drogenrückstand mit 50 ml MeOH nachextrahiert. Die MeOH-Extrakte werden vereinigt und auf 100 ml eingeeengt. Einspritzmenge für die HPLC-Analyse: 20 µl.

Literatur

- 1 V. J. Litvinenko und G. V. Obolentseva, Med. Prom. SSSR 18, 20 (1964); C.A. 62, 8280 (1965).
- 2 K. Formanek, H. Höller, H. Janisch und W. Kovac, Pharm. Acta Helv. 33, 437 (1958).
- 3 P. Forgacs, J.-F. Desconclois, J.-L. Poussat und A. Rabaron, Tetrahedron Lett. 48, 4783 (1978).
- 4 T. Nakanishi, A. Inada, K. Kambayashi und K. Yoneda, Phytochem. 24, 339 (1985).
- 5 E. Breitmeier und W. Voelter, ^{13}C -NMR-Spectroscopy, 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim 1978.
- 6 Dissertation Annette Speicher-Brinker, Berlin 1987.
- 7 K. R. Markham und B. Ternai, Tetrahedron 32, 2607 (1976).
- 8 S. Yahara und I. Nishioka, Phytochem. 23, 2108 (1984).

[Ph 537]