

Literatur

+ Teilergebnisse der Dissertation K. P. Lippke, Mainz.

- 1 H. Rommelspacher, C. Nanz, H. O. Borbe, K. J. Fehske, W. E. Müller und U. Wollert, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 314, 97 (1980).
- 2 C. Braestrup, M. C. Nielsen und C. E. Olsen, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2288 (1980).
- 3 Schering AG (Erf. U. Eder, G. Neef, A. Huth, D. Rahtz, R. Schmiechen, C. Braestrup, M. C. Nielsen, J. A. Christensen, M. Engelstoft und H. Schou) EP 0 030 254 (17. 6. 81); CA 95, 115508a (1981).
- 4 K.-P. Lippke, W. G. Schunack, W. Wenning und W. E. Müller, J. Med. Chem. 26, 499 (1983).
- 5 M. Cain, R. W. Weber, F. Guzman, J. M. Cook, S. A. Barker, K. C. Rice, J. N. Crawley, S. M. Paul und P. Skolnick, J. Med. Chem. 25, 1081 (1982).
- 6 Schering AG (Erf. G. Neef, U. Eder, R. Schmiechen, A. Huth, D. Rahtz, D. Seidelmann, W. Kehr, D. Palenschat, C. Braestrup, J. A. Christensen und M. Engelstoft) EP 0 054 507 (23. 6. 82); CA 98, 16663c (1983).
- 7 M. Hamon, Encéphale 9, 131 B (1983); CA 100, 202949k (1984).
- 8 K.-P. Lippke, W. E. Müller und W. G. Schunack, J. Pharm. Sci. 74, 676 (1985).

[Ph 194]

Arch. Pharm. (Weinheim) 320, 153–158 (1987)

Inhaltstoffe von Cupuliferae, 10. Mitt.¹⁾**Triterpensaponine aus *Fagus silvatica* L.**

Giovanni Romussi, Gaetano Bignardi,

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

Gioacchino Falsone,

Institut für Organische Chemie der Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-4000 Düsseldorf

und Detlef Wendisch,

Zentrale Dienste Forschung der Bayer AG, D-5090 Leverkusen-Bayerwerk
Eingegangen am 6. Februar 1986

Aus dem ethanolischen Blattextrakt von *Fagus silvatica* L. wurde neben *Ginsenosid-Ro* (3-O-[O- β -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-(β -D-glucopyranosyluronsäure)] oleanolsäure- β -D-glucopyranosylester (2)) ein neues Triterpensaponin isoliert und als 3-O-[O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-(β -D-glucopyranosyluronsäure)]-oleanolsäure- β -D-glucopyranosylester (1) identifiziert.

0365-6233/87/0202-0153 \$ 02.50/0

© VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, 1987

Constituents of Cupuliferae, X¹⁾: Triterpene Saponins from *Fagus silvatica* L.

From leaves of *Fagus silvatica* L. in addition to *ginsenoside* Ro [28-(β -D-glucopyranosyloxy)-28-oxoolean-12-en-3 β -yl 2-O-(β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosiduronic acid] (**2**) a new triterpene saponin has been isolated and identified as 28-(β -D-glucopyranosyloxy)-28-oxoolean-12-en-3 β -yl 3-O-(β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosiduronic acid (**1**).

In Fortsetzung unserer Arbeiten über Cupuliferae¹⁾ untersuchten wir *Fagus silvatica* L., aus dem bisher verschiedene Flavonoide^{2, 3)} isoliert worden sind. Aus ethanol. Extrakten der frischen Blätter isolierten wir durch SC an Polyamid, Sephadex LH-20 und DCC-Chromatographie zwei Triterpensaponine **1** und **2**, die nach saurer Totalhydrolyse Glucose, Glucuronsäure und Oleanolsäure lieferten. Alkalische Hydrolyse von **1** und **2** gab zwei neue Saponine **1a** und **2a**, die nach saurer Totalhydrolyse ebenfalls Glucose, Glucuronsäure und Oleanolsäure lieferten. Durch partielle saure Hydrolyse von **1a** und **2a** erhielt man ein Saponin, das durch DC-Vergleich mit authentischem Material als Oleanolsäure-3-O- β -D-glucuronopyranosid (**3**) identifiziert wurde. Diese Ergebnisse und die Elementaranalyse (s. exp. Teil) zeigten, daß **1a** und **2a** monodesmosidische Diglykoside der Oleanolsäure sind, wobei ein Molekül Glucuronsäure glykosidisch an die 3- β -Hydroxylgruppe des Aglykons und ein Molekül Glucose an die Glucuronsäure gebunden sind. Ein Vergleich der Signale der Kohlenstoffatome der Glucu-

Tab. 1: ¹³C-Shifts von **1** in Pyridin-D₅, gemessen bei 90.52 MHz

C-Atome	δ [ppm]	C-Atome	δ [ppm]
C- 1 von Aglykon	38.825	C-25	15.518
C- 2	26.133	C-26	17.506
C- 3	89.268	C-27	26.555
C- 4	39.512	C-28	176.413
C- 5	55.805	C-29	33.143*
C- 6	18.534	C-30	23.791
C- 7	33.143*	C- 1 von esterart. Glu	95.738
C- 8	39.967	C- 2	74.120
C- 9	48.038	C- 3	79.175
C-10	37.001	C- 4	71.677*
C-11	23.471	C- 5	78.872
C-12	~ 123 **	C- 6	62.360
C-13	144.146	C- 1' von GluUA an C-3-0	105.797
C-14	42.191	C- 2'	74.272
C-15	28.290	C- 3'	87.701
C-16	23.690	C- 4'	71.273
C-17	46.252	C- 5'	78.215
C-18	41.803	C- 6'	171.982
C-19	47.043	C- 1 von Glu an C-3'-0	106.640
C-20	30.767	C- 2	75.536
C-21	34.178	C- 3	78.653
C-22	32.587	C- 4	71.677*
C-23	28.138	C- 5	77.355
C-24	16.934	C- 6	62.579

* Doppelsignale

** z.T. unter Solvens

ronsäureeinheit im ^{13}C -NMR-Spektrum von **1a** (Tab. 3) mit denen von **3**⁴⁾ ergab eine deutliche Tieffeldverschiebung ($\Delta\delta = + 9.924$ ppm) für das C-3'-Signal und kleine Verschiebungen zu höherem Feld ($\Delta\delta = -1.077$ bzw. -1.756 ppm) für die Signale von C-2' und C-4'. Diese typischen Glykosidierungshifts⁴⁾ beweisen, daß die Glucose an C-3' der Glucuronsäure gebunden ist. Die Signale bei $\delta = 89.335$ ppm und bei $\delta = 180.069$ bzw. 172.284 ppm stimmen mit dem glykosidierten C-3 der Oleanolsäure und den freien Carboxylgruppen des Aglykons bzw. der Glucuronsäure überein^{4, 5)}. Aufgrund der ^{13}C -Shifts der anomeren Kohlenstoffsatome (Tab. 3) sind Glucose und Glucuronsäure β -pyranosidisch verknüpft⁴⁾. Damit ist gesichert, daß diesem Saponin die Struktur der 3-O-[O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-(β -D-glucopyranosyluronsäure)]-oleanolsäure (**1a**) zukommt. Die Signale bei $\delta = 62.579$ und 62.360 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum des genuinen Saponins **1** (CH_2OH von zwei Glucoseeinheiten) zeigen, daß diese Verbindung im Vergleich zu **1a** eine zusätzliche Glucose enthält, wie auch die Elementaranalyse ergab. Die Signale eines anomeren Kohlenstoffatoms im ^{13}C -NMR-Spektrum von **1** (Tab. 1) bei $\delta = 95.728$ ppm sowie eines anomeren Protons im ^1H -NMR-Spektrum bei $\delta = 6.350$ ppm (1H, d, $J = 7.8$ Hz, β -pyranosidische Form) legten sofort nahe, daß dieses zweite Molekül Glucose an eine Carboxylgruppe gebunden ist^{5, 6-8)}. Das ist in Einklang mit der Spaltbarkeit des Saponin **1** durch alkalische Hydrolyse. Die Kopplungskonstanten der Signale von zwei anomeren Protonen bei $\delta = 5.400$ ppm (1H, d, $J = 8.1$ Hz) bzw. 5.023 ppm (1H, d, $J = 7.6$ Hz) bestätigen

Tab. 2: ^{13}C -Shifts von **2** in Pyridin- D_5 , gemessen bei 90.52 MHz

C-Atome	δ [ppm]	C-Atome	δ [ppm]
C- 1 von Aglykon	38.737	C-25	15.518
C- 2	26.083	C-26	17.490
C- 3	89.302	C-27	26.555
C- 4	39.529	C-28	176.379
C- 5	55.856	C-29	33.126*
C- 6	18.517	C-30	23.774
C- 7	33.126*	C- 1 von esterart. Glu	95.704
C- 8	39.933	C- 2	74.104
C- 9	48.038	C- 3	79.141
C-10	36.951	C- 4	71.812
C-11	23.454	C- 5	78.838
C-12	~ 123 **	C- 6	62.343
C-13	144.113	C- 1' von GluUA an C-3-0	105.241
C-14	42.157	C- 2'	82.832
C-15	28.256	C- 3'	76.968
C-16	23.673	C- 4'	73.093
C-17	46.268	C- 5'	77.911
C-18	41.770	C- 6'	172.536
C-19	47.027	C- 1 von Glu an C-2'-0	105.898
C-20	30.750	C- 2	77.271
C-21	34.053	C- 3	78.097
C-22	32.553	C- 4	71.256
C-23	28.172	C- 5	77.726
C-24	16.715	C- 6	62.831

* Doppelsignal

** unter Solvens

die β -pyranosidische Form der anderen Zuckereinheiten^{7, 8)}. Im ^{13}C -Spektrum von **1** findet man zwei CO-Signale bei $\delta = 176.413$ und 171.982 ppm. Letzteres stimmt mit einem Wert von $\delta = 172.284$ ppm von **1a** gut überein, so daß es C-6' im Glucuronsäureteil zugeordnet werden muß. Die freie Carboxylgruppe an C-28 von **1a** absorbiert bei 180.069 ppm. Veresterung von 28-COOH in **1** führt zu Verschiebung nach höherem Feld, so daß ein Shift nach 176.413 ppm resultiert. Diese Befunde sind nur so zu interpretieren, daß diesem genuine Saponin die Struktur eines 3-O-[O- β -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-(β -D-glucopyranosyluronsäure)]-oleanolsäure- β -D-glucopyranosylesters (**1**) zukommen muß.

Das zweite natürliche Saponin hat ein ^{13}C -NMR-Spektrum (Tab. 2), dessen chemische Verschiebungen mit denjenigen des *Ginsenosids-Ro* (Chikusetsusaponin V = 3-O-[O- β -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-(β -D-glucopyranosyluronsäure)]-oleanolsäure- β -D-glucopyranosylester, **2**^{9, 10)} eng korrelierbar waren. DC- und IR-Vergleiche mit einer authentischen Probe bestätigten den ^{13}C -NMR-Befund. **1** wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. **2** wurde nur in einigen Panax-Arten gefunden⁹⁾ und dessen antithrombotische¹¹⁾ und Antisarcoma-Wirkung¹²⁾ beschrieben.

Herrn Prof. K. Hostettmann, Université de Lausanne, danken wir für eine Probe des Oleanolsäure-3-O- β -D-glucuronopyranosids. Herrn Prof. O. Tanaka, Hiroshima University, School of Medicine, sei für eine Probe von *Ginsenosid-Ro* gedankt.

Tab. 3: ^{13}C -Shifts von **1a** in Pyridin- D_5 , gemessen bei 90.52 MHz

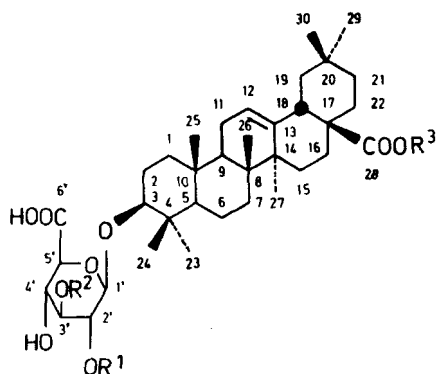
C-Atome	δ [ppm]	C-Atome	δ [ppm]
C- 1 von Aglykon	38.703	C-22	33.278
C- 2	26.234	C-23	28.189
C- 3	89.335	C-24	16.967
C- 4	39.529	C-25	15.468
C- 5	55.873	C-26	17.439
C- 6	18.551	C-27	26.504
C- 7	33.278*	C-28	180.069
C- 8	39.849	C-29	33.278*
C- 9	48.054	C-30	23.808*
C-10	37.052	C- 1' von GluUA an C-3-0	105.780
C-11	23.808	C- 2'	74.323
C-12	~ 122.6 **	C- 3'	87.924
C-13	144.820	C- 4'	71.644*
C-14	42.241	C- 5'	78.198*
C-15	28.391	C- 6'	172.284
C-16	23.808*	C- 1 von Glu an C-3'-0	106.505
C-17	46.723	C- 2	75.485
C-18	42.056	C- 3	78.602*
C-19	46.572	C- 4	71.644*
C-20	30.969	C- 5	78.198*
C-21	34.356	C- 6	62.528

* Doppelsignale

** z. T. unter Solvens

Experimenteller Teil

^1H -NMR-Spektren (360 MHz); ^{13}C -NMR-Spektren (90.52 MHz): Bruker-Spektrometer WH-360, Pyridin- d_5 , TMS int. Standard; IR-Spektren (KBr): Perkin Elmer 521; EI-MS: Varian Mat CH-5; Chromato-



Saponin	R ¹	R ²	R ³
1	H	β -D-Glucopyranosyl-	β -D-Glucopyranosyl-
1a	H	β -D-Glucopyranosyl-	H
2	β -D-Glucopyranosyl-	H	β -D-Glucopyranosyl-
2a	β -D-Glucopyranosyl-	H	H
3 (Oleanolsäure- 3-O- β -D-glucuronopyranosid)	H	H	H

graphie: DCC-Chromatograph Büchi 670. DC: Kieselgel 60-Fertigplatten (Fa. Merck). Fließmittel: A: Methanol/Chloroform (4:6, v/v); B: Essigester/Ethylmethylketon/Ameisensäure/Wasser (6:3. 5:0. 7:0. 7, v/v); Sprühreagenz: 50 proz. H₂SO₄, danach wurde 5 min auf 110–120° erhitzt.

Isolierung der Saponine 1 und 2

21 kg frische junge Blätter wurden im Mai und Juni 1984 in Capanne di Marcarolo-Bosio (Comunità montana Alta Val Lemme ed Alto Ovadese, Norditalien) gesammelt und mit EtOH bei Raumtemp. extrahiert. Nach Eindampfen des Extraktes i. Vak. wurde der Rückstand mit CCl₄ gewaschen und mit Wasser/n-Butanol aufgenommen. Die n-Butanollösung wurde eingengt und der Rückstand mit Wasser/Ether versetzt. Diese letzte wäßrige Phase wurde an einer Polyamidsäule (80 × 6 cm) mit Wasser als Elutionsmittel aufgearbeitet. Die Fraktionen, die 1 und 2 im Gemisch mit polyphenolischen Verbindungen enthielten, wurden eingedampft und der Rückstand (200 g) portionsweise (9 g) an einer Sephadex LH-20-Säule (55 × 5 cm) mit Methanol eluiert: Gemisch der Verbindungen 1 und 2, Feintrennung durch DCC-Chromatographie (Methanol/Chloroform/Wasser, 13:7:8, v/v).

1 (5 g), wurde durch Umkristallisierung aus Wasser/Aceton gereinigt; Prismen, Schmp.: Zers. oberhalb 225°. – IR (KBr): 3380 breit (–OH); 1725 (–COOH, COOR); 1385, 1360 (Oleananstruktur¹³) cm^{–1}. – ¹³C-NMR: s. Tab. 1. C₄₈H₇₆O₁₉ × 4.5 H₂O (1038.19), Ber. C 55.5, H 8.25 Gef. C 55.6, H 7.80.

2 (2.5 g), wurde durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt; Prismen, Schmp.: Zers. oberhalb 223°. – ¹³C-NMR: s. Tab. 2.

Alkalische Hydrolyse von 1 und 2.

Lösungen von 0,6 g 1 bzw. 0,35 g 2 in 12 bzw. 6 ml 5proz. KOH wurden 1 h unter Rückfluß erhitzt, man pufferte mit Eisessig/verd. HCl auf pH 3–4 und extrahierte mit n-Butanol. Die org. Phase wurde eingedampft. Ausb.: 0,5 g 1a bzw. 0,3 g 2a. 1a: amorphe Verbindung, die durch Lösen in EtOH und Fällen mit Essigester gereinigt wurde. IR (KBr): 3400 breit (OH); 1720 (COOH der Glucuronsäure); 1690 (COOH

der Oleanolsäure¹⁴); 1382, 1360 (Oleananstruktur¹³) cm^{-1} . – ^{13}C -NMR: s. Tab. 3. Für die Elementaranalyse wurden 0,2 g **1a** acetyliert¹⁴); 0,2 g Acetylderivat, das durch Umkristallisieren aus Ethanol/Ether gereinigt wurde; Nadeln mit Schmp. 248–249°. $\text{C}_{54}\text{H}_{78}\text{O}_{20} \times 1,5\text{H}_2\text{O}$ (1074,2), Ber. C 60,4, H 7,60 Gef. C 60,6, H 7,41.

2a: nach Umkristallisieren aus Methanol/Wasser Nadeln mit Schmp. 235–237° (Lit.¹⁰): 235°). $\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{14} \times 1,5\text{H}_2\text{O}$ (822,0), Ber. C 61,4, H 8,46 Gef. C 61,2, H 8,22.

Saure Partialhydrolyse von **1**, **1a**, **2** und **2a**.

Je 7–8 mg Saponin, 0,5 ml Dioxan und 0,5 ml 2N HCl wurden 10 min unter Rückfluß erhitzt. Durch die Prüfung mit den Fließmitteln A und B und Vergleich mit Testsubstanzen wurde aus **1** die Bildung von **1a** und **3**, aus **2** die Bildung von **2a** und **3**, aus **1a** und **2a** die Bildung von **3** festgestellt. Gefunden wurden folgende Rf-Werte:

Saponin	Laufmittelsystem	
	A	B
1	0.08	0.16
1a	0.19	0.39
2	0.06	0.10
2a	0.16	0.26
3 (Oleanolsäure-3-O- β -D-glucuronopyranosid)	0.33	0.77

Saure Totalhydrolyse der Saponine **1**, **1a**, **2** und **2a**.

Je 30–50 mg Verbindung, 1 ml Dioxan und 1 ml 2 N HCl erhitzte man 1 h unter Rückfluß und nahm nach Eindampfen i. Vak. den Rückstand mit Wasser/Essigester auf. Die wäßrige Phase wurde pc und dc wie beschrieben¹⁴) untersucht; der Vergleich mit Testsubstanzen zeigte Glucose und Glucuronsäure. Die org. Phase wurde eingedampft und der Rückstand aus EtOH/Wasser umkristallisiert. Das Aglykon ließ sich durch direkten Vergleich (IR, Schmp., MS, DC) mit einer authentischen Probe als Oleanolsäure identifizieren.

Literatur

- 1 9. Mitt.: G. Romussi, B. Parodi und F. Sancassan, Liebigs Ann. Chem. 1984, 1867.
- 2 M. Tissut, Phytochemistry 6, 1291 (1967).
- 3 H. H. Dietrichs und E. Schaich, Naturwissenschaften 50, 478 (1963).
- 4 F. Gafner, J. D. Msonthi und K. Hostettmann, Helv. Chim. Acta 68, 555 (1985).
- 5 C. D. Scheingart und A. B. Pomilio, Phytochemistry 23, 2907 (1984).
- 6 L. Birkofer, C. Kaiser, B. Hillges und F. Becker, Liebigs Ann. Chem. 725, 196 (1969).
- 7 R. U. Lemieux, R. K. Kulling, H. J. Bernstein und W. G. Schneider, J. Am. Chem. Soc. 80, 6098 (1958).
- 8 B. Capon und D. Thacker, Proc. Chem. Soc., London, 1964, 369.
- 9 O. Tanaka und R. Kasai, Fortschr. Chem. Org. Naturstr. 46, 1 (1984).
- 10 N. Kondo, Y. Marumoto und J. Shoji, Chem. Pharm. Bull. 19, 1103 (1971).
- 11 Nikan Korai Jinsen K. K. Kubo, Michinori Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 57, 163, 315; ref.: C. A. 98, 78132n (1983).
- 12 I. Takao, H. Chi-pei, C. Han-Hsun Jpn. Kokai Tokkyo Koho 81, 46, 817; C. A. 95, 103307w (1981).
- 13 G. Romussi, G. Falsone, A. E. G. Crea und E. Finner, Arch. Pharm. (Weinheim) 316, 499 (1983).
- 14 G. Romussi, G. Ciarallo, G. Falsone und C. Schneider, Liebigs Ann. Chem. 1979, 2028.