

Struktur von Echinacosid

Structure of Echinacoside

Hans Becker und Wei Ch. Hsieh

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, D-6900 Heidelberg

Renée Wylde und Colette Laffite

Ecole Nationale Supérieure de Chimie, F-3400 Montpellier

Claude Andary

Laboratoire de Botanique et de Gryptogamie, Faculté de Pharmacie, F-34060 Montpellier

Z. Naturforsch. 37 c, 351–353 (1982); received January 18, 1982

Echinacea angustifolia, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, Caffeoylglycoside, Echinacoside

The structure of echinacoside, isolated from *Echinacea angustifolia* D.C. (Asteraceae) roots has been determined by $^1\text{H-NMR}$ - and $^{13}\text{C-NMR}$ -spectra to be β -(3',4'-dihydroxyphenyl)-ethyl-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-[β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)]-(4-O-caffeoyl)-glucopyranoside (cf. Fig. 1).

Echinacosid wurde von Stoll *et al.* [1] aus den Wurzeln von *Echinacea angustifolia* D.C. (Asteraceae) erstmals isoliert. Die Analyse ergab 3 Moleküle Zucker (2 $\times$ Glucose, 1 $\times$ Rhamnose), wovon einer mit Kaffeesäure verestert war und ein Aglykon, Brenzcatechinethanol, das glykosidisch mit einer Glucose verbunden war. Die Verknüpfung der Zucker untereinander und die Stellung der Kaffeesäure konnten in der Arbeit mit den damaligen Mitteln nicht genau bestimmt werden.

Die gleichen Molekülbestandteile finden sich auch in anderen Esterglykosiden, die verbreitet bei den Tubifloren vorkommen [2–5]. Einigen dieser Verbindungen kommt eine ausgeprägte pharmakologische Wirkung zu (Potenzierung der Antitremorwirkung von L-Dopa, antihypertensive, analgetische [6] und antimikrobielle Wirkung [7]).

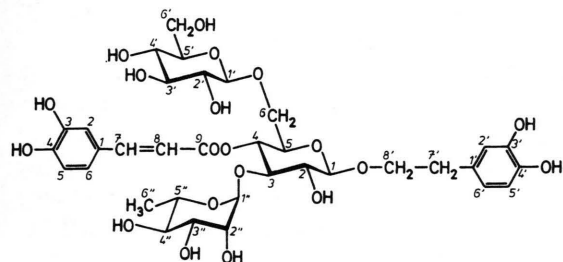


Abb. 1. Struktur von Echinacosid

Wir konnten kürzlich die genaue Struktur von zwei Verbindungen, dem Verbascosid und dem Orobanchosid mit Hilfe hochauflösender NMR-Spektroskopie ermitteln [8]. Durch Vergleich der dabei erhaltenen Protonen- und ^{13}C -Spektren mit denen des Echinacosids, konnten wir in der vorliegenden Arbeit die oben erwähnten noch unsicheren Verknüpfungspunkte festlegen.

Ergebnis und Diskussion

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum

Die aromatischen Protonen des Aglykons und der Kaffeesäure bilden 2 ABX-Systeme (vgl. Tab. I); die aliphatischen Protonen des Aglykons in α -Stellung zum Kern absorbieren bei hohem Feld ($\delta = 2,73$), während das Signal der CH_2 -Gruppe in Nachbarschaft der Glykosidbindung von den Zuckerprotonen erst nach Bestrahlen des Multipletts bei 2,73 sich unterscheiden lassen. Diese Einstrahlung zeigt die Nichtäquivalenz der 2 Protonen, wie dies auch für Verbascosid [8] und Myricosid [5] gezeigt werden konnte, ein Effekt der für prochirale Gruppen charakteristisch ist [9]. Innerhalb des Zuckerteils erkennt man leicht die am meisten entschirmten Signale, das heißt die drei anomeren Protonen und das Proton in α -Stellung (H-4G)* zur Kaffeesäure.

Tabelle I. ^1H -NMR Spektrum (250 MHz) vom Echinacosid in DMSO-d_6 (+3 Tropfen $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$). Die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten werden in Klammern angegeben.

	H.	
Kaffesäure	2	7,05 (d, 2)
	5	6,81 (d, 8)
	6	6,99 (dd, 2–8)
	7	7,50 (d, 16)
	8	6,23 (d, 16)
Anglykon	2'	6,67 (d, 2)
	5'	6,66 (d, 8)
	6'	6,54 (dd, 2–8)
	7'	2,73 (m, 7,5)
	8'	3,67, 3,92 (m, 12)
Glucose (G)	1	4,39 (d, 8)
	2	3,26 (t, 8)
	3	3,75 (m, 8–9,5)
	4	4,76 (t, 9,5)
	5	3,75 (m)
	6	3,54, 3,70 (m, 12)
Glucose (G')	1'	4,22 (d, 8)
	2'	2,99 (t, 8)
	3'	3,06–3,20
	4'	
	5'	
	6'	3,44, 3,67 (m, 12)
Rhamnose	1''	5,07 (d, 1)
	2''	3,73 (dd, 1–3)
	3''	3,33 (dd, 3–9,5)
	4''	3,14 (t, 9,5)
	5''	3,40 (m)
	6''	0,99 (d, 6)

Letzteres erscheint als Triplet bei $\delta = 4,76$, mit $J = 9,5$ Hz. Dies zeigt, daß die Kaffesäure nur mit den C-Atomen 2, 3 oder 4 einer Glucose oder mit C-4 einer Rhamnose verknüpft sein kann, denn nur in diesen Positionen stehen 3 Protonen axial zueinander. Um die Position C-2 G oder C-2' G zu bestätigen, haben wir die Protonen H-1 G und H-1' G bestrahlt, und damit die Protonen H-2 G bei $\delta = 3,26$ und H-2' G bei $\delta = 2,99$ identifiziert. Dabei bleibt das Signal bei $\delta = 4,76$ unbeeinflusst. Entkoppelt man dieses Proton ($\delta = 4,76$), dann stellt man lediglich eine Veränderung im Bereich $\delta = 3,75$ fest, aber nicht an den Protonen H-2 G bzw. H-2' G; wir können deshalb die Verknüpfung der Kaffesäure nur in 4 Stellung der Glucose annehmen (G)**. Die Entkopplung des Protons bei $\delta = 3,75$ liefert die Sequenz H-1 G, H-2 G, H-3 G, H-4 G. Damit ist die

** Die Glucose, die mit dem Aglykon verknüpft ist, wird als G bezeichnet; diejenige am Kettenende als (G').

Veresterungsstelle der Kaffesäure an C-4 G bewiesen. Unsere Beweisführung wird dadurch untermauert, daß die chemische Verschiebung der Protonen der Rhamnose im Vergleich zur freien Rhamnose speziell des H-4''R sich nicht unterscheiden.

Die Tab. I zeigt, daß die Signale der Rhamnose und der Glucose (G) identisch sind mit den entsprechenden Zuckern bei Verbascosid – mit der Ausnahme von H-5 G und H-6 G, die nach höherem Feld verschoben sind –, was zur Stellung der zweiten Glucose in C-6 G führt und ebenso zur Zuordnung der Substitution an C-3 G mit Rhamnose.

^{13}C -NMR-Spektrum

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von Echinacosid bestätigt die Kaffesäure und das gleiche Aglykon wie im Verbascosid. Gleichzeitig werden die zwei Moleküle Glucose und auch die Rhamnose nachgewiesen.

Die durch Protonenspektroskopie ermittelten Verknüpfungen können durch die ^{13}C -Spektren wie folgt bestätigt werden (Tab. II):

- Veresterung der Glucose C-4 durch die Kaffesäure, die dieses C-Atom abschirmt.
- Substitution von C-6 der Glucose, die mit dem Aglykon durch ein zweites Molekül Glucose verknüpft ist, aufgezeigt durch die bedeutende Entschirmung des C-6 und durch die Abschirmung des C-5 G wie dies früher schon beschrieben wurde [10].
- Substitution der Glucose in C-3 durch Rhamnose, aufgezeigt durch die Entschirmung des C-3 G und die Abschirmung des C-2 G. Wie wir beim Verbascosid zeigen konnten [8], verzeichnet das C-3 einen bedeutenden Entschirmungseffekt, der auf die Substitution mit Rhamnose zurückzuführen ist, überlagert von einem Abschirmungseffekt durch die β -ständige Kaffesäure.
- Der Wert des anomeren C-Atoms der Rhamnose ist in Übereinstimmung mit seiner Zuordnung. Das C-1''R absorbiert bei 101,27 ppm, was mit einer glykosidischen Bindung α -Rha (1 $\rightarrow$ 3) Glc übereinstimmt; bei einer glykosidischen Bindung α -Rha (1 $\rightarrow$ 6) Glc würde man dieses Signal bei etwa 100 ppm (im gleichen Lösungsmittel) [10] erwarten;
- schließlich zeigen alle Signale der zentralen Glucose (G) geringere Intensitäten, was auf die starke Substitution zurückzuführen ist.

Tabelle II. ^{13}C -NMR Spektrum von Echinacosid in DMSO-d_6 (+ 3 Tropfen $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$); (a) = Zuordnung ungewiß

Kaffeesäure								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
125,53	114,79	145,61	148,59	112,50	121,88	145,90	115,80	165,8
Aglykon								
1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	
129,28	116,41	144,96	143,55	115,05	119,62	35,1	70,44	
Zucker								
	1	2	3	4	5	6		
Glucose (G)	102,22	74,75	78,95	69,13	73,18	68,05		
Glucose (G')	103,42	73,49	76,88 ^a	69,96	76,5 ^a	61,05		
Rhamnose R''	101,27	70,44	70,44	71,71	68,81	18,18		

Methoden

Spektren

Die Spektren wurden mit einem CAMECA-Gerät gemessen, ^1H -NMR mit 250 MHz, ^{13}C mit 62,86 MHz. Die chemischen Verschiebungen werden als δ -Werte (ppm) angegeben, mit TMS als innerem Standard. Echinacosid wurde in DMSO-d_6 unter Zugabe von 3 Tropfen $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ gelöst, um einen Vergleich mit den Spektren von Verbascosid und Orobanchosid zu ermöglichen. Die Zuordnungen wurden z. T. durch selektive Bestrahlung der Protonen getroffen.

Isolierung von Echinacosid

Wurzeln von *Echinacea angustifolia* wurden aus dem Drogenhandel (Fa. Caesar und Loretz, Hilden) bezogen. Das Material wurde grob gepulvert und mit 50%igen Methanol 24 Stunden mazeriert. Der Extrakt wurde filtriert und zur Trockene einge-

dampft. Der Rückstand wurde in der Unterphase des Systems $n\text{-BuOH}/n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2/1/3 aufgenommen und mit Hilfe einer 70stufigen Craig-Verteilung mit der Oberphase als mobiler Phase des gleichen Lösungsmittelsystems getrennt. Die Echinacosid enthaltenden Elemente 20–35 wurden vereinigt, zur Trockene eingedampft und anschließend mit Hilfe der Droplet-Counter-Current-Chromatographie (DCC-A, Fa. Zinsser, Frankfurt) im gleichen System wie für die Craig-Verteilung (Oberphase mobile Phase) gereinigt. Die Reinheit wurde DC an Kieselgel F₂₅₄ mit der Oberphase des Lösungsmittelsystems überprüft; Naturstoffreagenz A als Sprühmittel.

Danksagung:

Wir danken M^{me} M. Bon (Laboratoire de RMN, Université Paul Sabatier, Toulouse) für die Aufnahme der Spektren.

- [1] A. Stoll, J. Renz u. A. Brack, *Helv. Chim. Acta* **33** (6), 1877 (1950).
- [2] L. Birkofer, C. Kaiser u. U. Thomas, *Z. Naturforsch.* **23b**, 1051 (1968).
- [3] G. Nonaka u. I. Nishioka, *Phytochemistry* **16**, 1265 (1977).
- [4] C. Andary, J. Pelletier, I. Soediro u. G. Privat, *Pharmacia Mediterr.* **12**, (1), 237 (1978).
- [5] R. Copper, P. H. Solomon, I. Kubo, K. Nakanishi, J. N. Shoolery u. J. L. Occolowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7953 (1980).
- [6] C. Andary, G. Privat, P. Chevallet, H. Orzalesi, H. H. Serrano u. M. Boucard, *Il Farmaco, Ed. Sci.* **35**, (1), 3 (1980).
- [7] C. Andary, J. L. Roussel, M. E. Motte, J. P. Rascol u. G. Privat, *Cryptog. Mycol.* **2**, 119 (1981).
- [8] C. Andary, R. Wyde, C. Laffite, G. Privat u. F. Winternitz, *Phytochemistry*, im Druck (angenommen 10. 09. 81).
- [9] A. Pavia, S. N. Un-Chuun u. J. M. Lacome, *Nouv. J. Chim.* **5**, (2), 101 (1981).
- [10] C. Laffite, A. M. Nguyen Phuoc Du, F. Winternitz, R. Wyde u. F. Pratviel-Sosa, *Carbohydr. Res.* **67**, 105 (1978).