

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der Familie Saxifragaceae*

Von

G. Billek und H. Kindl

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 9. Dezember 1961)

Es wird über die phenolischen Inhaltsstoffe von 19 verschiedenen Arten aus neun Gattungen der Familie der *Saxifragaceae* berichtet. Eine besondere Technik erlaubt es, auch jene Inhaltsstoffe eindeutig zu identifizieren, die nur in geringer Konzentration vorliegen: vor der papierchromatographischen Identifizierung wird eine fraktionierte Sublimation im „liegenden Rohr“ durchgeführt. Biogenetische und taxonomische Zusammenhänge werden diskutiert.

Ausgehend von Arbeiten über die Biogenese des Hydrangenols¹, eines Inhaltsstoffes der *Hydrangea macrophylla*², war die Kenntnis der übrigen Inhaltsstoffe dieser Art wünschenswert. In der Folge wurde die hierzu ausgearbeitete Technik verwendet, um einige weitere Gattungen innerhalb der Familie der *Saxifragaceae* zu untersuchen. Gerade für diese Familie, die sowohl ökologisch als auch systematisch als sehr uneinheitlich bekannt ist, bot eine taxonomische Auswertung einen besonderen Anreiz.

Als phenolische Inhaltsstoffe von *Saxifragaceen* waren bekannt: Bergenin^{3,4} (*Astilbe*, *Rodgersia*, *Bergenia*), Hydrochinon⁵ (als Arbutin in *Bergenia*), Protocatechusäure⁶ (*Escallonia*), Umbelliferon⁷, 7-Hydroxy-

* Herrn Prof. Dr. A. Zinke zum 70. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

¹ G. Billek und H. Kindl, Mh. Chem. **92**, 493 (1961).

² Y. Asahina und J. Asano, J. pharm. Soc. Japan **408**, 121 (1916); Ber. dtsh. chem. Ges. **63**, 429 (1930).

³ A. E. Tschitschibabin, A. W. Kirssanow, A. J. Korolew und N. N. Woroschzow, Ann. Chem. **469**, 93 (1929).

⁴ T. Yamaki und T. Inoue, Misc. Repts. Research Inst. Nat. Resources **10**, 13 (1946); Chem. Abstr. **50**, 9013 (1956).

⁵ A. E. Tschitschibabin, A. W. Kirssanow und M. G. Rudenko, Ann. Chem. **479**, 303 (1930).

⁶ J. A. Goodson, J. Chem. Soc. [London] **1938**, 999.

⁷ A. Hashimoto und T. Kawana, J. pharm. Soc. Japan **55**, 44 (1935).

8-methoxy-cumarin⁸, Hydrangenol^{2,9} und Phyllodulcin¹⁰ (*Hydrangea*) sowie einige häufig vorkommende Flavonoide und Anthocyanidine.

Methodik

Von relativ geringen Mengen des pflanzlichen Materials (100—200 g Frischgewicht) ausgehend, erhält man nach Extraktion und Glucosidspaltung in der üblichen Weise eine Säure- und eine Phenolfraktion. Durch eine papierchromatographische Analyse dieser beiden Fraktionen lassen sich die Hauptbestandteile meistens leicht erkennen. Die unmittelbar an die Gruppentrennung anschließende Chromatographie hat jedoch den Nachteil, daß Ballaststoffe zu Verschmierungen und Verzerrungen des Chromatogramms führen. Da außerdem die verschiedenen Inhaltsstoffe

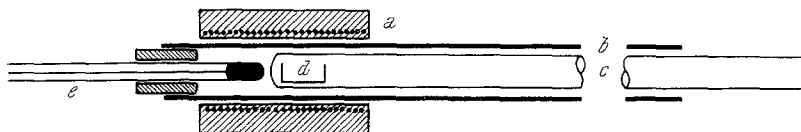


Abb. 1. Sublimation im „liegenden Rohr“. a: Heizkörper, b: Kupferrohr, c: Sublimationsrohr
d: Schiffchen, e: Thermometer

in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden sind, lassen sich die in geringer Menge vorliegenden Substanzen kaum nachweisen und identifizieren. Die Abtrennung der Ballaststoffe und eine weitgehende, manchmal bis zur vollständigen Isolierung eines Inhaltsstoffes führende Fraktionierung läßt sich durch eine vorhergehende Hochvakuumsublimation erzielen, die im sogenannten „liegenden Rohr“ (Abb. 1) durchgeführt wird. Dies ist eine Anordnung, die erstmals von *G. Schmidt*¹¹ zur Trennung von Pharmaka angegeben wurde und die sich auch für die Reinigung und Trennung kleiner Substanzmengen bei radiochemischen Arbeiten¹² sehr bewährt hat.

Die Substanz befindet sich in einem Schiffchen am zugeschmolzenen Ende eines etwa 50 cm langen Glasrohres (Durchmesser 10—12 mm). Zwischen Heizkörper und Glasrohr wird ein 30 cm langes Kupferrohr derart eingeschoben, daß sich längs des Glasrohres in Richtung der Sublimation ein Temperaturgefälle einstellt. Die Verwendung eines Kupferrohres ist hierzu

⁸ *B. A. Bohm, R. K. Ibrahim und G. H. N. Towers*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **39**, 1389 (1961).

⁹ *R. K. Ibrahim und G. H. N. Towers*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **38**, 627 (1960).

¹⁰ *Y. Asahina und Y. Ueno*, *J. pharm. Soc. Japan* **408**, 146 (1916); *H. Arakawa*, *Bull. chem. Soc. Japan* **33**, 200 (1960).

¹¹ *G. Schmidt*, *Arch. exper. Pathol. Pharmacol.* **229**, 67 (1956); *Mikrochim. Acta [Wien]* **1959**, 406.

¹² *G. Billek*, *Atompraxis* **4**, 371 (1958).

ausreichend und einfacher als die von *G. Schmidt*¹¹ angegebene asymmetrische Heizspirale. Die endständige Öffnung des Kupferrohres trägt ein Thermometer, die Öffnung des Glasrohres wird mit einer Hochvakuumanlage verbunden.

Infolge des Temperaturgefälles längs des Rohres wird eine mehr oder minder überlappende Trennung der einzelnen Substanzen entsprechend

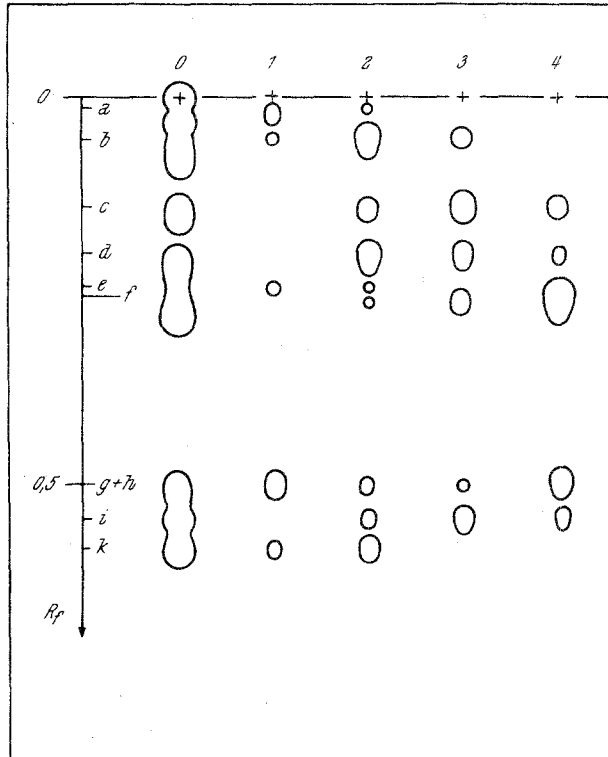


Abb. 2. Trennung der „Säurefraktion“ aus *Astilbe chinensis*; a: Kaffeesäure, b: Gentisinsäure, c: 4-Hydroxyphenyl-essigsäure, d: 4-Hydroxybenzoesäure, e: p-Cumarsäure, f: 2-Hydroxyphenyl-essigsäure, g: Syringasäure (in Zone 1 und 2), h: 7-Hydroxy-8-methoxy-cumarin (in Zone 3 und 4), i: Vanillinsäure, k: Ferulasäure

ihrer Flüchtigkeit erzielt; verschiedene Zonen der Substanzablagerung sind meistens klar erkennbar. Durch Zerschneiden des Rohres werden mehrere Fraktionen (2—5) gewonnen, die je nach der Menge ganz oder teilweise auf das Papierchromatogramm gebracht werden. Als Beispiel sei hier die Trennung der „Säurefraktion“ aus *Astilbe chinensis* (Abb. 2) angeführt, wobei das Sublimationsrohr in vier Zonen zerschnitten wurde. Die einzelnen Zonen sind von Nr. 1—4 in zunehmender Flüchtigkeit bezeichnet. 0 ist das Chromatogramm der nicht sublimierten Rohfraktion.

Das Auftreten korrespondierender Flecken in den Chromatogrammen der einzelnen Sublimationszonen sagt gleichzeitig etwas über die Flüchtigkeit der betreffenden Verbindung aus. Dies kann als zusätzliches Kriterium zur Identifizierung herangezogen werden.

Für die Papierchromatographie der in Frage kommenden Verbindungen bewährte sich besonders das Lösungsmittelgemisch Benzol—Eisessig—Wasser (4:2:1), welches absteigend gut auftrennt und scharfe Flecken gibt. Tabelle 4 enthält die R_F -Werte und Farbreaktionen der in dieser Arbeit nachgewiesenen Substanzen. Daneben wurden auch zahlreiche andere Verbindungen getestet, die im Zusammenhang mit biogenetischen Untersuchungen interessant erschienen. Für besondere Trennungen wurden zwei weitere Gemische (Tab. 5 und 6) herangezogen. In Zweifelsfällen wurde der Fleck eluiert und mittels UV-Spektrum identifiziert.

Die phenolischen Inhaltsstoffe der einzelnen Gattungen

Die oben beschriebene Methode der Auftrennung und Bestimmung der Inhaltsstoffe wurde bei 9 Gattungen (19 Arten) der Familie der *Saxifragaceae* angewendet. Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten über die Biogenese des Hydrangenols wurden von der Gattung *Hydrangea* 9 Arten untersucht. Besondere Berücksichtigung fand auch die Gattung *Astilbe*, da in dieser Gattung erstmals 2-Hydroxy-phenylessigsäure als Inhaltsstoff höherer Pflanzen aufgefunden werden konnte¹³.

Die Untersuchungen bezogen sich ausschließlich auf Phenole, Phenolcarbonsäuren und die in größerer Menge auftretenden Flavonoide. Anthocyanidine wurden nicht berücksichtigt. Auch die Frage, in welcher Form die jeweiligen Inhaltsstoffe in den Pflanzen vorkommen, ob als Glucosid, Ester¹⁴ oder in freier Form, wurde offengelassen.

Hydrangea:

Innerhalb der Gattung *Hydrangea* verhalten sich 8 der untersuchten 9 Arten weitgehend ähnlich in bezug auf Vorkommen und Verteilung der phenolischen Inhaltsstoffe (Tab. 1). Die Art *H. macrophylla* (Gartenhortensie) hingegen fällt gänzlich aus dem Rahmen. Die Gesamtmenge aller phenolischen Inhaltsstoffe ist hier 10—20fach größer als jene der übrigen *Hydrangea*-Arten und beträgt ca. 3%, bezogen auf das Trockengewicht. Hydrangenol [3-(4'-Hydroxyphenyl)-3,4-dihydro-8-hydroxy-isocumarin] und Isovanillinsäure wurden nur in dieser Art gefunden. Bei keiner der zahlreichen Untersuchungen aber konnte Phyllo dulcin*

* Herrn Prof. Dr. *H. Arakawa*, Kyoto (Japan), danken wir für die Überlassung einer Probe des Phyllo dulcins. 7-Hydroxy-8-methoxy-cumarin wurde uns in dankenswerter Weise von Herrn Dr. *R. K. Ibrahim*, Alexandria (Ägypten), zur Verfügung gestellt.

¹³ *H. Kindl* und *G. Billek*, Nature [London] im Druck.

¹⁴ *J. B. Harborne* und *J. J. Corner*, Biochem. J. **81**, 242 (1961).

[3-(3'-Hydroxy-4'-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-8-hydroxy-isocumarin] nachgewiesen werden, obwohl dieses in japanischen *Hydrangea*-Arten in beträchtlicher Menge enthalten ist¹⁰. Hingegen wurde in allen Arten 7-Hydroxy-8-methoxy-cumarin* gefunden, welches erst vor kurzem von *B. A. Bohm*, *R. K. Ibrahim* und *G. H. N. Towers*⁸ in *H. macrophylla* entdeckt und aufgeklärt werden konnte. Ausgehend von einer größeren Menge der Blüten von *H. macrophylla* wurde eine Trennung ausgearbeitet, die eine präparative Isolierung von Hydrangenol, p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Umbelliferon und Kämpferol gestattet.

Astilbe:

Die Gattung *Astilbe*, von der drei Arten (*A. chinensis*, *japonica* und *dauidii*) untersucht wurden, unterscheidet sich von den anderen Gattungen der *Saxifragaceae* durch das Auftreten der 2-Hydroxy-phenylelessigsäure¹³. Diese Verbindung, die bisher nur im Kulturmedium von *Penicillium*-Arten¹⁵ gefunden werden konnte, ist in wesentlicher Menge (0,05% des Trockengewichtes, d. i. etwa 40% der gesamten phenolischen Inhaltsstoffe) vorhanden. 4-Hydroxy-phenylelessigsäure, die in allen anderen untersuchten Gattungen der Familie nachgewiesen werden konnte, tritt hier in größerer Menge neben 4-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure, Gallussäure, Gentsinsäure und dem 7-Hydroxy-8-methoxy-cumarin auf. Die Unterschiede zwischen den drei Arten sind nur gering. Auffallend ist das Fehlen von Umbelliferon und der geringe Gehalt an Derivaten der Zimtsäure. *A. dauidii* beinhaltet zusätzlich noch ein Phenol (R_F : 0,80**; UV: braun; diazot. Sulfanilsäure: gelb) in größerer Menge, welches nicht identifiziert wurde.

Für die Synthese der 2-Hydroxy-phenylelessigsäure wurden bereits einige Vorschriften veröffentlicht^{16,17}, die jedoch nur mäßige Ausbeuten liefern. Diese Verbindung kann besser durch Oxydation der 2-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure¹⁸ dargestellt werden, die ihrerseits in ebenfalls sehr guter Ausbeute aus Salicylaldehyd über das 5-(2'-Hydroxybenzyl)-hydantoin¹⁹ erhalten wird.

Von den nachfolgend angeführten Gattungen wurde jeweils nur eine Art untersucht; die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Die Aus-

** Die Angaben von R_F -Werten im Text bezieht sich auf das Lösungsmittelgemisch *A* des experimentellen Teiles.

¹⁵ *N. K. King* und *A. N. Hambly*, Roy. Austral. Chem. Inst. J. & Proc. **17**, 403 (1950); Chem. Abstr. **45**, 5661 (1951).

¹⁶ *A. Ghosh*, *R. B. Mukherjee* und *C. R. Raha*, Science and Culture [India] **20**, 95 (1954).

¹⁷ *P. Pfeiffer* und *K. Bauer*, Chem. Ber. **80**, 16 (1947).

¹⁸ *G. Billek*, Mh. Chem. **92**, 343 (1961).

¹⁹ *G. Billek*, Mh. Chem. **92**, 352 (1961).

Tabelle 2

Inhaltsstoffe	<i>Bergenia subciliata</i>	<i>Escallonia langleyensis</i>	<i>Deutzia scabra</i>	<i>Philadelphus coronarius</i>	<i>Ribes rubrum</i>	<i>Heuchera drummondii</i>	<i>Rodgersia aesculifolia</i>
p-Hydroxybenzoesäure	++	++	++	++	++	++	++
Protocatechinsäure	+	+	+	+	+	+	+
Vanillinäure	—	++	++	++	++	++	++
Gentisinsäure	++	+	++	++	++	++	++
Gallussäure	++	—	—	—	—	—	++
Syringasäure	+	+	+	+	+	+	+
p-Hydroxyphenyllessigsäure	+	+	+	+	+	+	+
p-Cumarsäure	—	++	++	++	++	++	++
Kaffeesäure	—	++	++	++	++	++	++
Ferulasäure	—	++	++	++	++	++	++
Sinapinsäure	—	++	++	++	++	++	++
Hydrochinon	++	—	—	—	—	—	—
Umbelliferon	—	+	+	+	+	+	+
7-Hydroxy-8-methoxy-cumarin	—	—	—	—	—	—	—

beute an phenolischen Inhaltsstoffen betrug stets etwa 0,15%, bezogen auf das Trockengewicht.

Philadelphus coronarius (Pfeifenstrauch) ist etwas reicher an phenolischen Inhaltsstoffen (0,3%) als die anderen Arten. 7-Hydroxy-8-methoxycumarin⁸, ein Inhaltsstoff aller *Hydrangea*-Arten, wurde auch hier gefunden. *P. coronarius* zeigt weitgehende Ähnlichkeit der Inhaltsstoffe mit *Deutzia scabra* und *Heuchera drummondii* und unterscheidet sich demnach nur durch den Gehalt des bereits erwähnten Cumarinderivates. *Escalonia* × *langleyensis* enthält zusätzlich eine nicht identifizierte Verbindung (R_F : 0,29; UV [NH₃]: hellgelb). *Rodgersia aesculifolia* weicht nur durch den Gehalt an Gallussäure von der durchschnittlichen Verteilung der Inhaltsstoffe ab.

Ribes rubrum ist relativ arm an den üblichen phenolischen Inhaltsstoffen. Es fehlen Gallussäure und Kaffeesäure. Hauptinhaltsstoffe sind 4-Hydroxy-benzoessäure und Vanillinsäure neben Gentisin- und Protocatechusäure. Hingegen konnte in geringerer Menge eine Reihe noch unbekannter Phenole (R_F : 0,10, 0,71 und 0,80; UV: dunkelbraun) gefunden werden, die bereits im sichtbaren Licht, insbesondere mit NH₃, gelbe bis orange Färbungen zeigen.

Von allen untersuchten Arten aus der Familie der *Saxifragaceae* fällt *Bergenia subciliata* völlig aus dem Rahmen. Die Derivate der Zimtsäure fehlen; hingegen wurde eine große Menge Hydrochinon, wahrscheinlich aus Arbutin, neben viel Gallussäure und Gentisinsäure nachgewiesen. Nicht identifiziert wurden eine Säure (R_F : 0,37; diazot. Sulfanilsäure: rotgrau) und eine Gruppe von Phenolen (R_F : 0,12, 0,34, 0,58, 0,84; UV: 0; diazot. Sulfanilsäure: rotviolett), die relativ flüchtig und leicht sublimierbar sind. Es sei erwähnt, daß die Gattung *Bergenia* im Bergenin³ ein Isocumarinderivat mit C-glykosidischer Bindung enthält, also einen Vertreter einer eigenartigen und neuerdings mehr beachteten Substanzklasse²⁰. Ein Vergleich der Struktur des Bergenins mit anderen Isocumarinderivaten (Hydrangenol, Phyllodulcin) erscheint aus biogenetischen Überlegungen interessant, vor allem, da in der *Bergenia* keine Zimtsäure gefunden werden konnte. Bergenin kann jedoch nach dem hier beschriebenen Verfahren nicht isoliert werden.

Zur Biogenese der phenolischen Inhaltsstoffe

Die Durchführung einer systematischen Analyse ausgewählter Gattungen und Arten aus der Familie der *Saxifragaceae* erfolgte aus mehreren Gründen. So sollte erstens für die Arbeiten über die Biogenese der Hydrangeasäure und des Hydrangenols aus der Gattung *Hydrangea* jene

²⁰ L. Hörhammer und H. Wagner, in: Recent Developm. Chem. of Natural Phenolic Compds., London 1961.

Art gefunden werden, die einen möglichst hohen Gehalt an diesen Verbindungen aufweist. Zweitens wurden bei der Verwendung radioaktiver Vorstufen bei der Auswertung der Papierchromatogramme aktive Verbindungen beobachtet, die in so geringer Menge vorlagen, daß sie vorerst nicht identifiziert werden konnten. Nach Kenntnis der Inhaltsstoffe war in vielen Fällen eine Zuordnung eindeutig möglich. Die Identifizierung möglichst vieler radioaktiver Folgeprodukte nach Gabe einer markierten Vorstufe erscheint bei Biosyntheseuntersuchungen dann unumgänglich notwendig, wenn es gilt, Zwischenstufen einer Reaktionsfolge zu erkennen, die nur in geringer stationärer Konzentration vorliegen.

Als Beispiele seien hier die Versuchsergebnisse von Langzeitinfusionen (24 Stdn.) bei Blättern von *H. macrophylla* angeführt. Es wurden Acetat-1-¹⁴C, Glucose-¹⁴C-(G) und p-Cumarsäure-2-¹⁴C eingesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte nach der eingangs beschriebenen Methode, die Papierchromatogramme wurden in Lösungsmittelgemisch *A* entwickelt. Tab. 3 gibt die Aktivitätsmaxima am Papierchromatogramm wieder; die Identifizierung der einzelnen „peaks“ erfolgte erst nach Re-chromatographie in den Gemischen *B* und *C*.

Tabelle 3

Substanz	Infusion von		
	Acetat-1- ¹⁴ C	Glucose- ¹⁴ C-(G)	p-Cumarsäure-2- ¹⁴ C
Kaffeesäure	—	—	+
Kämpferol	++	+	+
Umbelliferon	—	++	++
p-Cumarsäure	—	+	(+)
?	—	++	—
7-Hydroxy-8-methoxy- cumarin	—	++	++
Ferulasäure	—	—	+
Hydrangenol	++	++	++
X ₃	++	+	—

Diese Resultate stimmen mit den Ansichten überein, daß Zimtsäure-derivate, die selbst aus Glucose gebildet werden, Vorstufen von Cumarinen²¹ und des Ringes B der Flavonoide²² und Stilbene²³ darstellen, während Acetat und seine Folgeprodukte zum Aufbau des Ringes A der Flavonoide²⁴ und Stilbene²³ beitragen. Bezüglich der bisher noch nicht

²¹ S. A. Brown, G. H. N. Towers und D. Wright, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **38**, 143 (1960).

²² H. Grisebach und W. D. Ollis, *Experientia* [Basel] **17**, 4 (1961).

²³ G. Billek und H. Kindl, in Vorbereitung.

²⁴ J. E. Watkin, E. W. Underhill und A. C. Neish, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **35**, 229 (1957); H. Grisebach, *Z. Naturforsch.* **12b**, 227 (1957).

aufgeklärten Verbindung X_3 sei auf eine frühere Arbeit¹ verwiesen. Es sei ferner erwähnt, daß *H. macrophylla* in beträchtlicher Menge (vgl. exper. Teil) Derivate sowohl des Cumarins (vor allem Umbelliferon) und Flavonols (Kämpferol) als auch des Stilbens (Hydrangenol) enthält und damit zur Aufklärung der heute noch weitgehend unbekanntem Verzweigung der Biosynthesewege ein ideales Studienobjekt darstellt. Es ist auffallend, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei einer Gabe von Glucose-¹⁴C-(G) die in *H. macrophylla* vorhandenen Derivate der Benzoesäure inaktiv waren. Hierfür ist vorerst noch keine Erklärung möglich. An sich sollten diese Verbindungen aktiv sein, sofern sie über Shikimisäure-5-phosphat nach dem von *B. D. Davis* und *D. B. Sprinson*²⁵ angegebenen Schema gebildet werden. Auch die Derivate der Zimtsäure zeigen eine vergleichsweise nur unbedeutende Aktivität.

Zur chemischen Taxonomie der Familie *Saxifragaceae**

Die in dieser Arbeit bevorzugt untersuchte Gattung *Hydrangea* (Tab. 1) zeigt eine Differenzierung der Inhaltsstoffe, die durchaus mit der taxonomischen Gliederung übereinstimmt. Die Sektion *Calyptranthe* (*H. petiolaris*) und die Subsektionen *Asperae* (*H. sargentiana*, *aspera* und *villosa*) und *Heteromallae* (*H. paniculata*, *bretschneideri* und *xanthoneura*) sind weitgehend ähnlich. Die Subsektion *Petalanthae* (*H. macrophylla*) ist durch das Auftreten von Hydrangenol und Isovanillinsäure deutlich zu unterscheiden.

Die Gattung *Astilbe* ist durch den Ausfall von Umbelliferon und das signifikante Vorkommen von 2-Hydroxyphenylessigsäure deutlich abgegrenzt gegenüber der Gattung *Rodgersia*. Beide Gattungen wurden bisher zum Untertribus *Astilbinae* gestellt, sind aber cytologisch durch verschiedene Chromosomengrundzahlen getrennt. Das Ergebnis der Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe unterstreicht die Verschiedenheit dieser beiden Gattungen.

Die in Tab. 2 aufgeführten Arten aus sieben verschiedenen Gattungen wurden recht willkürlich aus der Familie der *Saxifragaceae* ausgewählt. Diese vorläufigen Untersuchungen genügen noch nicht, um weitergehende Schlüsse auf die verwandtschaftlichen Zusammenhänge zu ziehen. Starke Abweichungen von der Standardkombination der Inhaltsstoffe sind bei *Ribes* und *Bergenia* deutlich zu erkennen. Die Gattung *Ribes* wird neuerdings auf Grund verschiedener morphologischer und cytologischer Befunde

* Herrn Dozent Dr. *F. Ehrendorfer*, Universität Wien, danken wir für wertvolle Diskussion und im besonderen für die Bearbeitung dieses Abschnitts.

²⁵ Zusammenfassung: *D. B. Sprinson*, Adv. Carbohydrate Chem. **15**, 235 (1960).

als eine eigene Familie betrachtet, was nun auch durch das Analyseergebnis eine gewisse Bestätigung findet. Die Gattung *Bergenia* hingegen erscheint in biochemischer Hinsicht stärker isoliert, als es auf Grund der bisherigen taxonomischen Gliederung zu erwarten wäre.

Bezüglich der Problematik einer chemischen Taxonomie sei auf die richtungweisenden Untersuchungen von *H. Erdtman*²⁶ über das Vorkommen der Inhaltsstoffe des Kernholzes der Ordnung *Pinales* verwiesen.

Das Pflanzenmaterial wurde vom Botanischen Garten der Universität Wien (Direktor: Prof. Dr. *L. Geitler*) zur Verfügung gestellt, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei. Der Österreichischen Akademie der Wissenschaften gilt unser Dank für eine Subventionierung dieser Arbeit aus den Mitteln der *Seegen*-Stiftung.

Experimenteller Teil

Isolierung der Säure- und Phenolfraktion

100—200 g frische Blätter werden mit 90proz. Äthanol zweimal je 10 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Vorheriges Entfetten der Blätter mit Petroläther ist bei *Bergenia* empfehlenswert. Die erkalteten Lösungen werden filtriert und durch Abdampfen im Vak. vom Äthanol befreit. Der Rückstand wird mit 100 ml 2proz. NaOH und 100 ml Äther versetzt und durch Schütteln zwischen beide Phasen verteilt. Die wäßrige Phase wird abgetrennt, einmal mit Äther gewaschen und durch Zusatz von Salzsäure auf einen Gehalt von etwa 5% HCl gebracht. Zur Spaltung der Glucoside wird diese Lösung 1 Stde. auf siedendem Wasserbad erhitzt. Die erkaltete Lösung wird erschöpfend im kontinuierlichen Extraktor mit Äther extrahiert. Die äther. Lösung wird erst mit 2proz. NaHCO₃-Lösung, dann mit 2proz. NaOH ausgeschüttelt. Nach Ansäuern werden Säure- und Phenolfraktion durch Ausäthern und Abdampfen der Lösungen erhalten.

Die Fraktionierung erfolgt durch Sublimation im „liegenden Rohr“, welches bereits im allgemeinen Teil beschrieben ist. Ein Vak. von 10⁻³ Torr und eine maximale Temp. von 200° im Inneren des Kupferrohres ist ausreichend.

Papierchromatographie

Gemisch A: Tab. 4 enthält die R_F-Werte, die mit Benzol—Eisessig—Wasser (4:2:1) (absteigend, Schleicher & Schüll 2043b) erhalten wurden, sowie die Farbreaktionen mit diazot. Sulfanilsäure (in 10proz. Na₂CO₃-Lösung).

Gemisch B: Bei besonderer Berücksichtigung von höher hydroxylierten Säuren, die in Gemisch *A* nur schlecht auftreten, wurde zusätzlich das Gemisch Benzol—Wasser—Methyläthylketon—Armeisensäure (6:3:3:1) absteigend herangezogen. Die R_F-Werte sind in Tab. 5 aufgeführt. Zum Nachweis wird die Reaktion mit FeCl₃ verwendet.

²⁶ *H. Erdtman*, Holz als Roh- und Werkstoff **11**, 245 (1953); *H. Erdtman*, in: Biochemistry of Wood, London 1959.

Tabelle 4

Substanz	R_f	UV	UV + NH ₃	diazot. Sulfanilsäure
<i>Benzoessäuren</i>				
2-Hydroxy-	0,80	—	—	gelb
3-Hydroxy-	0,18	—	—	gelb
4-Hydroxy-	0,20	—	—	gelb
2-Hydroxy-6-methyl-	0,84	—	—	orange
2,3-Dihydroxy-	0,24	—	—	rotgrau
2,4-Dihydroxy-	0,11	—	—	gelbbraun
2,5-Dihydroxy-	0,06	blau	hell	grau
3,4-Dihydroxy-	0,02	—	—	grau
3,5-Dihydroxy-	0,01	—	—	rotbraun
2-Hydroxy-3-methoxy-	0,60	violett	—	dunkelgelb
3-Hydroxy-4-methoxy-	0,39	—	—	orange
3-Hydroxy-5-methoxy-	0,22	—	—	rotorange
4-Hydroxy-3-methoxy-	0,54	—	—	orange
2,4-Dihydroxy-6-methyl-	0,22	—	—	gelb
3,4,5-Trihydroxy-	0,00	—	—	grün
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy- ...	0,50	—	—	rosa
<i>Phenyllessigsäuren</i>				
2-Hydroxy-	0,26	—	—	gelborange
4-Hydroxy-	0,14	—	—	rot
4-Hydroxy-3-methoxy-	0,42	—	dunkelviolett	rotviolett
<i>Phenylpropionsäuren</i>				
4-Hydroxy-	0,26	—	—	weinrot
4-Hydroxy-3-methoxy-	0,57	—	—	rotviolett
3-Hydroxy-4-methoxy-	0,56	—	—	rotviolett
<i>Zimtsäuren</i>				
2-Hydroxy-	0,34	weiß	hellgelb	gelborange
4-Hydroxy-	0,25	—	blau	weinrot
3,4-Dihydroxy-	0,02	blau	hellgelb	graubraun
3-Hydroxy-4-methoxy-	0,50	blau	gelb	rotorange
4-Hydroxy-3-methoxy-	0,58	blau	hellblau	blauviolett
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy- ...	0,48	blau	hellgrün	violett
<i>Phenylmilchsäuren</i>				
4-Hydroxy-	0,02	—	—	rot
<i>Phenylbrenztraubensäuren</i>				
4-Hydroxy-	0,04	—	—	rotgrau
4-Hydroxy-3-methoxy-	0,07	gelb	gelb	rotgrau
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy- ...	0,12	blau	blau	rotgrau
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy- ...	0,12	blau	blau	rotgrau
<i>Cumarine</i>				
7-Hydroxy-	0,90	—	weiß (NaOH)	—
7-Hydroxy-	0,21	blau	hellblau	gelb

Substanz	R _f	UV	UV + NH ₃	diazot. Sulfanilsäure
<i>Cumarine</i>				
7-Hydroxy-6-methoxy-	0,28	blau	hellblau	gelb
7-Hydroxy-8-methoxy-	0,50	—	gelb	schw. gelb
Chlorophorin	0,17	—	blauviolett	braun
Hydrangenol	0,74	blau	hellblau	orange
Hydrochinon	0,04	—	schwach dunkelviolett	grau
Isovanillin	0,62	—	gelb	rotorange
1,4-Naphthochinon	0,93	schwarz	gelb	—
β-Naphthol	0,86	—	blau	orange
Orcin	0,10	—	—	gelborange
Phylloleucin	0,83	blau	hellblau	orange
Pinosylvin	0,46	—	blau	gelborange
Pinosylvinmonomethyläther	0,91	—	blau	gelborange
Pterostilben	0,87	blau	hellblau	gelb
Resorcin	0,05	—	—	gelbbraun
Rhapontigenin	0,03	blau	blauviolett	rotbraun
Vanillin	0,76	dunkel	dunkel	orange

Tabelle 5

Gallussäure	0,05
Protocatechusäure	0,29
Kaffeensäure	0,38, 0,43
Gentisinsäure	0,71

Gemisch C: In Zweifelsfällen wurde zusätzlich ein drittes Gemisch verwendet: n-Butanol—konz. wäBr. NH₃—Äthanol—Benzol (5:3:2:1, einphasig, absteigend). Die R_F-Werte sind in Tab. 6 wiedergegeben, bezüglich der Farbreaktionen vgl. Tab. 4. Das von *L. Reio*²⁷ beschriebene „Gemisch B“ eignet sich vor allem zur Unterscheidung der Zimtsäuren von den Hydrozimtsäuren.

Tabelle 6

4-Hydroxybenzoesäure	0,30	p-Cumarsäure	0,40
3-Hydroxybenzoesäure	0,41	o-Cumarsäure	0,49
Vanillinsäure	0,29	Ferulasäure	0,39
Isovanillinsäure	0,33	7-Hydroxy-8-methoxy-	
2-Hydroxyphenylelessigsäure	0,60	cumarin	0,72

Die Testsubstanzen waren Naturprodukte oder wurden nach bekannten Methoden synthetisiert. Lediglich für die 2-Hydroxyphenylelessigsäure wurde eine neue Synthese ausgearbeitet.

Synthese der 2-Hydroxyphenylelessigsäure

2,0 g 2-Hydroxyphenylbrenztraubensäure-lacton¹⁸ werden in 15 ml 2n NaOH durch kurzes Erwärmen gelöst. Danach wird auf 0° gekühlt, langsam

²⁷ *L. Reio*, *J. Chromatogr.* **1**, 338 (1958).

mit 2,0 ml 30proz. H_2O_2 versetzt und über Nacht bei Zimmertemp. belassen. Nach Ansäuern und guter Kühlung werden 1,51 g (80%) vom Schmp. 148° erhalten.

Präparative Trennung der Hauptinhaltsstoffe von *H. macrophylla*

200 g lufttrockene Blüten von *H. macrophylla* werden mit 80proz. Äthanol heiß extrahiert. Der Abdampfrückstand wird mit 2proz. NaOH versetzt und mehrmals ausgeäthert; die Ätherlösungen werden verworfen. Nach dem Ansäuern der wäßrigen Phase (pH 3) werden die Inhaltsstoffe sorgfältig zwischen Äther und Wasser verteilt. Die vereinigten äther. Lösungen schüttelt man erst mit 5proz. $NaHCO_3$ -Lösung („freie Säuren“), dann mit 2proz. NaOH („freie Phenole“) aus. Die wäßrige Phase wird auf einen Gehalt von 5% HCl eingestellt, 1 Stde. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt und anschließend ausgeäthert. Durch Ausschütteln werden, wie oben beschrieben, die „gebundenen Säuren“ und „gebundenen Phenole“ erhalten.

Gebundene Säuren: Nach Ansäuern der $NaHCO_3$ -Lösung wird erneut mit Äther extrahiert, der hellbraune sirupöse Rückstand (1,6 g) der Ätherlösung mit wenig Wasser unter Zusatz von Tierkohle zum Sieden erhitzt und rasch filtriert. Die schwer lösliche Hydrangeasäure verbleibt mit der Tierkohle auf dem Filter. Dieser Rückstand wird ausgeäthert und liefert nach Sublimation (0,01 Torr, 180°) unter Lactonisierung reines Hydrangenol (0,1 g). Aus dem Filtrat erhält man als erstes ein schwach gelbliches Kristallisat (0,4 g) vom Schmp. 196°, welches reine Kaffeesäure darstellt. Durch Ausäthern der Mutterlauge wird eine weitere Säurefraktion erhalten, die durch fraktionierte Sublimation im „liegenden Rohr“ (0,01 Torr, 165°) vorwiegend p-Cumarsäure und Isovanillinsäure, neben geringeren Mengen anderer Säuren (vgl. Tab. 1) ergibt, während unter diesen Bedingungen Kaffeesäure und Hydrangenol nicht flüchtig sind.

Freie Säuren: Diese Fraktion (1,0 g) wird analog aufgetrennt.

Gebundene Phenole: Die Rohfraktion (2,0 g) enthält vorwiegend Hydrangenol. Zur Erfassung der in nur geringer Menge vorliegenden übrigen Phenole wird zweckmäßigerweise das Hydrangenol aufgespalten und als Hydrangeasäure abgetrennt. Hierzu erhitzt man diese Fraktion mit 5proz. Na_2CO_3 -Lösung 1 Stde. unter Rückfluß zum Sieden. Die erkaltete Lösung wird mit $NaHCO_3$ versetzt und erschöpfend ausgeäthert. Der Rückstand (0,15 g) der Ätherlösung wird im „liegenden Rohr“ (0,01 Torr, 195°) fraktioniert sublimiert. In drei scharfen Zonen werden erstens Kämpferol (papierchromatographisch rein, Schmp. 275°), zweitens Umbelliferon (mit einer Spur Hydrochinon) und schließlich drittens ein Gemisch von 7-Hydroxy-8-methoxycumarin und einer noch unbekanntem Verbindung vom Schmp. 208° erhalten. Bei kürzerer Sublimationsdauer verbleibt ein Teil des schwer flüchtigen Kämpferols im Schiffchen.

Aus der angesäuerten $NaHCO_3$ -Lösung wird durch Extraktion mit Äther und Sublimation des Rückstandes reines Hydrangenol (1,6 g, Schmp. 182°) erhalten.

Freie Phenole: Die Rohfraktion (1,7 g) wird analog aufgearbeitet und liefert ebenfalls vorwiegend Hydrangenol (1,3 g).

Mehrfache Durchföhrung dieser Aufarbeitung ergab folgende Gesamtausbeuten: 2,0—3,0 g (= 1,0—1,5%) Hydrangenol, 1,0 g (= 0,5%) Kaffeesäure, 0,6—1,2 g (= 0,3—0,6%) p-Cumarsäure und etwa 0,1 g (= 0,05%) Kämpferol.