

## ANTHRACEN-DERIVATE IN KALLUSKULTUREN AUS *CASSIA ANGUSTIFOLIA*\*

HILMAR FRIEDRICH und STEFFEN BAIER

Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie der Universität Münster, Hittorfstrasse 56,  
West Germany

(Eingegangen 24. Oktober 1972. Angenommen 1. Januar 1973)

**Key Word Index**—*Cassia angustifolia*; Leguminosae; senna; tissue culture; anthraquinones; dianthrone.

**Abstract**—Callus cultures from cotyledons of *Cassia angustifolia* were shown to contain dianthrone. Proof of their structures was obtained by co-chromatography (TLC), oxidative cleavage and UV analysis. The basic components chrysophanol, physcion, rheum emodin, aloe emodin and rhein have been isolated and identified by UV and IR analysis.

**Zusammenfassung**—In Kalluskulturen aus den Keimblättern von *Cassia angustifolia* wurden Dianthrone nachgewiesen und durch Cochromatographie, oxidative Spaltung und UV-Spektroskopie identifiziert. Die am Aufbau des Inhaltsstoff-Spektrums beteiligten Anthrachinone Chrysophanol, Physcion, Rheumemodin, Aloeemodin und Rhein wurden isoliert und ihre Identität durch UV- und IR-Spektroskopie abgesichert.

### EINLEITUNG

SEIT einigen Jahren werden in steigendem Maße Kalluskulturen aus Arzneipflanzen angelegt, um die Voraussetzungen für eine mögliche *in vitro*-Produktion pharmazeutisch wichtiger pflanzlicher Stoffwechselprodukte zu erarbeiten.<sup>1,2</sup> In diesem Sinne wurden in unserem Institut Kalluskulturen aus den Keimblättern von *Cassia angustifolia* Vahl isoliert. Nach oxidativer Hydrolyse konnten wir darin die Anthrachinone Chrysophanol, Physcion, Rheumemodin, Aloeemodin, und Rhein dc nachweisen<sup>3</sup> und damit gleichzeitig mit Furuya und Kojima<sup>4</sup> erstmalig über das Auftreten von Anthracen-Derivaten in Kalluskulturen berichten. An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der detaillierten chemischen Analyse folgen.

### ERGEBNISSE

#### *Grundverbindungen*

Die bereits dc nachgewiesenen Grundverbindungen Chrysophanol, Physcion, Rheumemodin, Aloeemodin und Rhein<sup>3</sup> wurden aus einem oxidativ hydrolysierten Gesamtextrakt durch präparative DC isoliert und ihre Identität durch UV- und IR-Spektroskopie abgesichert. Nach saurer Hydrolyse eines Gesamtextraktes wurde neben einem Gemisch oxidierter und reduzierter Anthracen-Aglykone Glucose als Zuckerkomponente dc nachgewiesen.

\* Teil der Dissertation S. Baier, Münster (1971).

<sup>1</sup> REINHARD, E. (1967) *DAZ* **107**, 1201.

<sup>2</sup> BECKER, H. (1969) *Mitt. Dtsch. Pharmaz. Ges.* **39**, 273.

<sup>3</sup> BAIER, S. und FRIEDRICH, H. (1970) *Naturwissenschaften* **57**, 548.

<sup>4</sup> FURUYA, T. und KOJIMA, H. (1971) *Phytochemistry* **10**, 1607.

*Dianthron-glucoside*

Die Glucoside wurden aus einem Gesamtextrakt mit Äther ausgefällt,<sup>5</sup> der besonders interessierende Dianthron-Komplex durch Säulenchromatographie an Sephadex LH20 abgetrennt<sup>6</sup> und nach saurer Hydrolyse untersucht.

Die Identifizierung der Einzelverbindungen erfolgte dc durch Cochromatographie mit partialsynthetisch hergestellten Vergleichssubstanzen, durch den dc Nachweis der Spaltprodukte nach der oxidativen Spaltung<sup>7</sup> und durch UV-Spektroskopie.<sup>8,9</sup> Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

TABELLE 1. DIANTHRONE IN KALLUSKULTUREN AUS SENNA

Verbindung	$R_f$ -Werte		Oxidationsprodukte	UV-Absorptionsmaxima (nm)			
	Laufmittel 1*	Laufmittel 2†		258	292	356	
Chrysophanol-Anthron	0,92	0,94	Chrysophanol	270			
Chrysophanol-Dianthron		0,60	Chrysophanol	272			365
Palmidin D		0,49	Chrysophanol + Physcion	270			362
Rheidin B	0,84		Chrysophanol + Rhein	270			372
Palmidin C	0,72		Chrysophanol + Rheumemodin	272			362
Sennidine A + B	0,70		Rhein	270			375
Palmidin B	0,61		Chrysophanol + Aloeemodin	270			362
Rheidin A	0,48		Rhein + Rheumemodin	270			371
Sennidine C + D	0,38		Rhein + Aloeemodin	270			370
Rheumemodin-Dianthron	0,33		Rheumemodin	277			365
Palmidin A	0,20		Rheumemodin + Aloeemodin	277			363
$\alpha$ -Aloeemodin-Dianthron	0,14		Aloeemodin	270			365
$\beta$ -Aloeemodin-Dianthron	0,10		Aloeemodin	270			365

\* Benzol/Eisessig (100%) (4:1), Sorbens: Kieselgel G akt.<sup>10</sup>

† Petroläther (40–60°)/Äthylformiat/Ameisensäure (90:4:1); Sorbens: Kieselgel G/Kieselgur G (1:6)<sup>11</sup>

Von den nachgewiesenen Verbindungen waren die Derivate des Chrysophanols mengenmäßig am stärksten vertreten. Die Rheinderivate konnten hingegen nur nach dem Auftragen größerer Extraktmengen eindeutig lokalisiert und identifiziert werden. Für das Vorkommen weiterer Derivate des Physcions neben Palmidin D wurden keine Anhaltspunkte gewonnen. Das auf den Chromatogrammen nachgewiesene Chrysophanol-Anthron dürfte bei der Aufarbeitung der Dianthrone entstanden sein und ist demzufolge als Abbauprodukt anzusehen.

*Aglucone*

Die Untersuchung der Aglucone, die bei der Gewinnung der Glucoside abgetrennt wurden, ergab ein mit den Ergebnissen der Analyse der Glucoside im wesentlichen übereinstimmendes Bild. Neben den Anthrachinonen Chrysophanol, Physcion, Rheumemodin, Aloeemodin und Rhein ließen sich Chrysophanol-Anthron sowie die von Chrysophanol, Rheumemodin und Aloeemodin abgeleiteten Dianthrone abtrennen. Es waren dies die Iso-Dianthrone des Chrysophanols und Rheumemodins, die Palmidine B, C und D, Rheidin A sowie vermutlich Palmidin A und die beiden Iso-Dianthrone des Aloeemodins. Die letztgenannten, im unteren  $R_f$ -Bereich liegenden Verbindungen wurden jedoch durch eine intensiv gelbbraun gefärbte Zone teilweise überlagert, so daß ihr Nachweis gestört wurde.

<sup>5</sup> MICHAUD, M. J. (1967) *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **106**, 135.

<sup>6</sup> ZWAVING, J. H. (1968) *J. Chromatog.* **35**, 562.

<sup>7</sup> STOLL, A., BECKER, B. und KUßMAUL, W. (1949) *Helv. Chim. Acta* **32**, 1892.

<sup>8</sup> AUTERHOFF, H. und SCHERFF, F. C. (1960) *Arch. Pharm.* **293**, 918.

<sup>9</sup> MOES, A. (1964) *J. Pharmac. Belg.* **19**, 173.

<sup>10</sup> FRIEDRICH, H. und BAIER, S. (1973) *Planta Med.* **23**, 24.

<sup>11</sup> LABADIE, R. P. (1971) Dissertation, Leiden.

und ihre Identifizierung demzufolge unsicher ist. Die im oberen  $R_f$ -Bereich liegenden Verbindungen wurden durch oxidative Spaltung<sup>7</sup> sowie durch Cochromatographie identifiziert. Mit Ausnahme von Rheidin *B* wurden weitere Rhein-Derivate nicht gefunden.

#### *Gehaltsbestimmung und pharmakologische Prüfung*

Der Gesamtgehalt der Kallusgewebe an Anthracen-Derivaten wurde photometrisch nach DAB 7 DDR bestimmt. Die gefundenen Werte lagen im Mittel bei 0,4 % und damit bei etwa einem Viertel von denen guter Handelsware. Damit stehen die Ergebnisse der pharmakologischen Prüfung an Ratten in Übereinstimmung: In 4-fach höherer Konzentration als die Handelsdroge verabfolgt, zeitigten die Kallusgewebe an den Versuchstieren eine nur wenig schwächere Abführwirkung.

#### DISKUSSION

Die Untersuchung zeigte, daß das Inhaltsstoff-Spektrum der Kallusgewebe nur z.T. mit dem der Sennesblätter des Handels identisch ist und qualitativ wesentliche Unterschiede gegenüber diesem aufweist. Auffällig ist vor allem der geringe Gehalt an Sennosiden. Man muß jedoch berücksichtigen, daß die Kulturen aus Kotyledonen angelegt wurden und eine völlige Übereinstimmung ihres Inhaltsstoff-Spektrums mit dem ausgewachsener Pflanzen von vornherein kaum zu erwarten war.<sup>12</sup> Entgegen den Beobachtungen anderer Autoren, daß Kallusgewebe häufig andere Inhaltsstoffe bilden als die Mutterpflanze,<sup>1</sup> zeigte die Untersuchung aber auch, daß die gleichen Grundverbindungen am Aufbau des Inhaltsstoff-Spektrums in Keimblatt und Kallus beteiligt sind. Insbesondere ließ sich das in den Keimblättern nachgewiesene Physcion<sup>10</sup> auch aus dem Kallusgewebe isolieren.

Ob sich bei den Kulturen die Befähigung zur Synthese dieser Verbindungen auch weiter erhalten wird, müssen künftige Untersuchungen zeigen. Die genetische Instabilität von Kallusgeweben, die sich teilweise in Änderungen ihrer Wuchsform äußern kann, sowie der Einfluß nicht-genetischer Faktoren, etwa der Kulturbedingungen, könnten möglicherweise den Verlust bestimmter Syntheseleistungen oder auch Verschiebungen innerhalb des Stoffwechsels bedingen.<sup>1,13,14</sup> Inwieweit sich nun in den Kallusgeweben Synthese und Akkumulation der Anthracen-Derivate, z.B. durch Wachstoffsstoffgaben, steuern lassen,<sup>2</sup> muß sich jedoch aus weiteren Untersuchungen ergeben. Erste Versuche zeigten indessen, daß von einer modifizierten Zusammensetzung des Nährbodens und veränderten physikalischen Kulturbedingungen zumindest keine qualitativen Veränderungen im Inhaltsstoff-Spektrum der Kulturen zu erwarten sind.

#### EXPERIMENTELLES

*Pflanzenmaterial und Kalluskultur.* Die an den Kotyledonen steriler Keimpflanzen von *Cassia augustifolia* Vahl induzierten Kallusgewebe wurden auf einem Nährboden aus Mineralsalzen nach Murashige und Skoog,<sup>15</sup> Vitaminen nach Reinert und White,<sup>16</sup> Aminosäuren nach Koblitz,<sup>17</sup> Kokosmilch (15 %), Saccharose (4 %), Agar (1 %) sowie 4,0 mg/l 2,4-D und 0,05 mg/l Kinetin in 3-4wöchigen Passagen 1 Jahr lang im Licht (Bestrahlung mit 100-W-Birnen im 12-h-Rhythmus) und bei 30° kultiviert.<sup>18,19</sup> Für die chemische Analyse wurden die Gewebe 2 Tage bei 50° unter Frischluftzufuhr getrocknet, anschließend fein gepulvert.

<sup>12</sup> FAIRBAIRN, J. W. und SHRESTHA, A. B. (1967) *Phytochemistry* **6**, 1203.

<sup>13</sup> REINERT, J. (1965) *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **78**, 1.

<sup>14</sup> REINERT, J. (1968) *Naturwissenschaften* **55**, 170.

<sup>15</sup> MURASHIGE, T. und SKOOG, F. (1962) *Physiol. Plant.* **15**, 473.

<sup>16</sup> REINERT, J. und WHITE, PH. R. (1956) *Physiol. Plant.* **9**, 177.

<sup>17</sup> KOBLITZ, H. (1967) *Qual. Plantar.* **14**, 70.

<sup>18</sup> BAIER, S. (1971) Dissertation, Münster.

<sup>19</sup> FRIEDRICH, H. und BAIER, S. (1973) *Z. Pflanzenphysiol.* **69**, 168.

**Extraktion und Aufbereitung der Extrakte.** Zur Gewinnung der Dianthrone wurden 20,0 g Gewebe mit  $4 \times 200$  ml MeOH jeweils 10 Min. mit einem Schnellrührgerät extrahiert. Nach Abzentrifugieren wurden die Lösungen vereinigt und bei  $30^\circ$  unter vermindertem Druck auf 100 ml eingedunstet. Daraus wurden durch Zugabe von 600 ml Äther (peroxidfrei) die Glucoside ausgefällt und sofort gefriergetrocknet. Die Ätherlösung enthält die Aglucone. 0,5 g des Glucosidniederschlags wurden auf eine Sephadex LH20 Säule gebracht (Säule  $40 \times 650$  mm, beschickt mit 60 g Sephadex in 300 ml 70% MeOH) und mit 70% MeOH eluiert. Die ersten 4 Zonen (150 ml) wurden zusammen aufgefangen und bei  $30^\circ\text{C}$  unter vermindertem Druck zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wird mit 200 ml 2,5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  15 Min. im Wasserbad hydrolysiert und die Lösung nach dem Abkühlen mit  $3 \times 200$  ml Äther (peroxidfrei) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde darauf Zucker untersucht, die Ätherlösungen vereinigt, durch Ausschütteln mit 400 ml 0,05 M Boraxlösung<sup>20</sup> und 400 ml Boratpuffer (pH 7,36),<sup>21</sup> in drei Fraktionen aufgetrennt, die nach Ansäuern und erneuter Ätherextraktion untersucht wurden.

**Dünnschichtchromatographie.** *Anthrachinone.* Laufmittel: Petroläther (40–60°)–EtOAc–HOAc (45:5:3);<sup>10</sup> Sorbens: Kieselgel G; Detektion: KOH (5%, methanolisch). *Dianthron-Aglucone.* (1) Laufmittel: Benzol–HOAc (4:1);<sup>10</sup> Sorbens: Kieselgel G; die Platten müssen unmittelbar vor dem Auftragen der Substanzen durch 30 Min. Erhitzen auf  $120^\circ$  aktiviert werden! Detektion: Pyridin–MeOH (1:1).<sup>11</sup> (2) Laufmittel: Petroläther (40–60°)– $\text{HCO}_2\text{Et}$ – $\text{HCO}_2\text{H}$  (90:4:1);<sup>11</sup> Sorbens: Kieselgel G/Kieselgur G (1:6), Detektion: Pyridin–MeOH (1:1). *Zucker* (1) Laufmittel: EtOAc–Pyridin– $\text{H}_2\text{O}$  (12:5:6);<sup>22</sup> Sorbens: Cellulose, Detektion: Anilinchthalat. (2) Laufmittel: MeCN– $\text{CS}_2$ – $\text{H}_2\text{O}$  (17:1:2);<sup>23</sup> Sorbens: Kieselgel G ( $4 \times$  entwickeln); Detektion: Anilinchthalat. Die Herstellung der Vergleichssubstanzen erfolgte nach den bekannten Verfahren<sup>8,11,24</sup>

**Pharmakologische Untersuchung.** Die abführende Wirkung der Kallusgewebe wurde nach der Methode von Lou<sup>25</sup> mit der Handelsdroge verglichen. Verwendet wurden männliche Albino-Ratten (Gewicht 400–450 g), denen die Drogen in wäßriger Aufschwemmung mit der Schlundsonde oral verabreicht wurden. Danach wurden die Tiere für 16 hr unter Beobachtung gestellt. Während der Versuchsdauer bekamen sie Futter und Wasser *ad lib*.

**Anerkennungen.**—Die pharmakologische Prüfung der Kallusgewebe wurde von Herrn Dr. S. Magda, Pharmakologische Abteilung der Fa. Roha-Werk, Bremen, durchgeführt. Wir danken Herrn Dr. Magda auch an dieser Stelle sehr herzlich für seine Hilfsbereitschaft, Herrn Dr. W. Pilarczyk für die Genehmigung zur Durchführung der Versuche. Wir danken der Fa. Roha-Werk, Bremen, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

<sup>20</sup> LEMLI, J., DEQUEKER, R. und CUVEELE, J. (1964) *Planta med.* **12**, 107

<sup>21</sup> LEMLI, J., DEQUEKER, R. und CUVEELE, J. (1964) *Pharmac. Weekblad* **99**, 589.

<sup>22</sup> SHELLARD, E. J. und JOLLIFFE, G. H. (1969) *J. Chromatog.* **40**, 458

<sup>23</sup> WIELE, H. und HORAK, E. (1970) *J. Chromatog.* **47**, 527.

<sup>24</sup> KINGET, R. (1967) *Planta Med.* **15**, 233

<sup>25</sup> LOU, T. C. (1949) *J. Pharm. Pharmacol.* **1**, 673.