

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; dianthrones.

Abstract—Callus cultures from cotyledons of *Cassia angustifolia* were shown to contain dianthrones. 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, Aloemodin 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.^{1,2} 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, Aloemodin, und Rhein dc nachweisen³ und damit gleichzeitig mit Furuya und Kojima⁴ 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, Aloemodin und Rhein³ 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 oxiderter und reduzierter Anthracen-Aglykone Glucose als Zuckerkomponente dc nachgewiesen.

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

¹ REINHARD, E. (1967) *DAZ* **107**, 1201.

² BECKER, H. (1969) *Mitt. Dtsch. Pharmaz. Ges.* **39**, 273.

³ BAIER, S. und FRIEDRICH, H. (1970) *Naturwissenschaften* **57**, 548.

⁴ FURUYA, T. und KOJIMA, H. (1971) *Phytochemistry* **10**, 1607.

Dianthrone-glucoside

Die Glucoside wurden aus einem Gesamtextrakt mit Äther ausgefällt,⁵ der besonders interessierende Dianthrone-Komplex durch Säulenchromatographie an Sephadex LH20 abgetrennt⁶ 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 Spaltung⁷ und durch UV-Spektroskopie.^{8,9} Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

TABELLE 1. DIANTHRONE IN KALLUSKULTUREN AUS SENNA

Verbindung	<i>R</i> _f -Werte		Oxidationsprodukte	UV-Absorptionsmaxima (nm)		
	Laufmittel 1*	Laufmittel 2†		258	292	356
Chrysophanol-Anthrone	0,92	0,94	Chrysophanol	258	292	356
Chrysophanol-Dianthrone		0,60	Chrysophanol	270	365	
Palmidin D		0,49	Chrysophanol + Physcion	272	362	
Rheindin B	0,84		Chrysophanol + Rhein	270		372
Palmidin C	0,72		Chrysophanol + Rheumemodin	272	362	
Sennidin A + B	0,70		Rhein	270		375
Palmidin B	0,61		Chrysophanol + Aloemodin	270	362	
Rheindin A	0,48		Rhein + Rheumemodin	270		371
Sennidin C + D	0,38		Rhein + Aloemodin	270		370
Rheumemodin-Dianthrone	0,33		Rheumemodin	277	365	
Palmidin A	0,20		Rheumemodin + Aloemodin	277	363	
α-Aloeemodin-Dianthrone	0,14		Aloeemodin	270	365	
β-Aloeemodin-Dianthrone	0,10		Aloeemodin	270	365	

* Benzol/Eisessig (100%) (4:1); Sorbens: Kieselgel G akt.¹⁰

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

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-Anthrone 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, Aloemodin und Rhein ließen sich Chrysophanol-Anthrone sowie die von Chrysophanol, Rheumemodin und Aloemodin abgeleiteten Dianthrone abtrennen. Es waren dies die Iso-Dianthrone des Chrysophanols und Rheumemodins, die Palmidine B, C und D, Rheindin A sowie vermutlich Palmidin A und die beiden Iso-Dianthrone des Aloemodins. 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.

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

⁶ ZWAVING, J. H. (1968) *J. Chromatog.* **35**, 562.

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

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

⁹ MOES, A. (1964) *J. Pharmac. Belg.* **19**, 173.

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

¹¹ LABADIE, R. P. (1971) Dissertation, Leiden.

und ihre Identifizierung demzufolge unsicher ist. Die im oberen R_f -Bereich liegenden Verbindungen wurden durch oxidative Spaltung⁷ 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, zeigten 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.¹² Entgegen den Beobachtungen anderer Autoren, daß Kallusgewebe häufig andere Inhaltsstoffe bilden als die Mutterpflanze,¹ 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 Physcion¹⁰ 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.^{1,13,14} Inwieweit sich nun in den Kallusgeweben Synthese und Akkumulation der Anthracen-Derivate, z.B. durch Wuchsstoffgaben, steuern lassen,² 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 angustifolia* Vahl induzierten Kallusgewebe wurden auf einem Nährboden aus Mineralsalzen nach Murashige und Skoog,¹⁵ Vitaminen nach Reinert und White,¹⁶ Aminosäuren nach Koblitz,¹⁷ 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.^{18,19} Für die chemische Analyse wurden die Gewebe 2 Tage bei 50° unter Frischluftzufuhr getrocknet, anschließend fein gepulvert.

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

¹³ REINERT, J. (1965) *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **78**, 1.

¹⁴ REINERT, J. (1968) *Naturwissenschaften* **55**, 170.

¹⁵ MURASHIGE, T. und SKOOG, F. (1962) *Physiol. Plant.* **15**, 473.

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

¹⁷ KOBLITZ, H. (1967) *Qual. Plantar.* **14**, 70.

¹⁸ BAIER, S. (1971) Dissertation, Münster.

¹⁹ 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 × 200 ml MeOH jeweils 10 Min mit einem Schnellrührgerät extrahiert. Nach Abzentrifugieren wurden die Lösungen vereinigt und bei 30° unter verminderterem Druck auf 100 ml eingengt. Daraus wurden durch Zugabe von 600 ml Äther (peroxidfrei) die Glucoside ausgefällt und sofort gefriergetrocknet. Die Ätherlosung enthält die Aglucone. 0,5 g des Glucosidniederschlages wurden auf eine Sephadex LH20 Saule gebracht (Saule 40 × 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°C unter verminderterem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit 200 ml 2,5% H₂SO₄ 15 Min. im Wasserbad hydrolysiert und die Lösung nach dem Abkuhlen mit 3 × 200 ml Äther (peroxidfrei) extrahiert. Die wässrige Phase wurde dc auf Zucker untersucht, die Ätherlösungen vereinigt, durch Ausschütteln mit 400 ml 0,05 M Boraxlösung²⁰ und 400 ml Boratpuffer (pH 7,36),²¹ in drei Fraktionen aufgetrennt, die nach Ansäuern und erneuter Ätherextraktion dc untersucht wurden.

Dunnschichtchromatographie. Anthrachinone. Laufmittel: Petrolather (40–60°)–EtOAc–HOAc (45:5:3);¹⁰ Sorbens: Kieselgel G; Detektion: KOH (5%, methanolisch). *Dianthrone-Aglucone.* (1) Laufmittel: Benzol–HOAc (4:1),¹⁰ Sorbens: Kieselgel G; die Platten müssen unmittelbar vor dem Auftragen der Substanzen durch 30 Min. Erhitzen auf 120° aktiviert werden! Detektion: Pyridin–MeOH (1:1)¹¹ (2) Laufmittel: Petrolather (40–60°)–HCO₂Et–HCO₂H (90:4:1);¹¹ Sorbens: Kieselgel G/Kieselgur G (1:6), Detektion: Pyridin–MeOH (1:1). *Zucker* (1) Laufmittel: EtOAc–Pyridin–H₂O (12:5:6);²² Sorbens: Cellulose, Detektion: Anilinphthalat. (2) Laufmittel: MeCN–CS₂–H₂O (17:1:2),²³ Sorbens: Kieselgel G (4 × entwickeln); Detektion: Anilinphthalat. Die Herstellung der Vergleichssubstanzen erfolgte nach den bekannten Verfahren.^{8,11,24}

Pharmakologische Untersuchung. Die abführende Wirkung der Kallusgewebe wurde nach der Methode von Lou²⁵ 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.

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

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

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

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

²⁴ KINGET, R. (1967) *Planta Med.* **15**, 233.

²⁵ LOU, T. C. (1949) *J. Pharm. Pharmacol.* **1**, 673.