

CHEMOTAXONOMISCHE UNTERSUCHUNGEN IN DER GATTUNG *VITEX* L.*

R. HÄNSEL, CH. LEUCKERT, H. RIMPLER und K. D. SCHAAF

Institut für Pharmakognosie der Freien Universität, Berlin

(Eingegangen 10 August 1964)

Zusammenfassung—Fünf *Vitex*-Arten wurden auf das Vorkommen von Flavonoiden, Iridoiden, ätherischem Öl und *Vitex*-Triterpen I untersucht. Während vier der geprüften Arten in ihrer chemischen Zusammensetzung Ähnlichkeiten aufwiesen, weicht *Vitex megapota mica* in den Stoffwechselfähigkeiten ab. Morphologisch nahe verwandte Arten können beträchtliche Unterschiede in ihrem Sekundärstoffwechsel aufweisen, so dass von einer voreiligen Heranziehung chemischer Merkmale zur taxonomischen Gliederung abgeraten wird.

Abstract—Five *Vitex* species have been examined for the presence of flavonoids, pseudo-indicans (iridoids), volatile oils and *Vitex*-Triterpene I. The chemical composition is similar for four species with the striking exception of *Vitex megapota mica*. Related species have been shown to possess remarkable differences in their secondary products. It seems as if chemical characteristics are more indicative of physiological similarities than of morphological plant relationships.

EINLEITUNG

DIE Gattung *Vitex* L. mit 380 Arten und Unterarten¹ ist ein vom systematischen Standpunkt aus ziemlich einheitliches Taxon, dessen Vertreter in Tropen und Subtropen weit verbreitet sind und sich an unterschiedliche Standortsbedingungen angepasst haben.

Es schien uns von Interesse, stichprobenartig zu prüfen, ob der Sekundärstoffwechsel ein sehr einheitliches Gepräge hat oder ob er mehr als heterogen zu betrachten ist. Wir untersuchten im vorliegenden Fall zunächst fünf Arten auf das Vorkommen von vier Stoffgruppen. Die von uns bezüglich der Inhaltsstoffe verglichenen Species gehören verschiedenen geographischen Zonen an.

Vitex agnus-castus L. stammt aus dem mediterranen Gebiet. *Vitex megapota mica* (Spreng.) Moldenke (*Vitex montevidensis* Cham.)² ist eine südamerikanische Pflanze.†). *Vitex trifolia* L. und *Vitex negundo* L. kommen ursprünglich in einigen Gebieten Ost- bzw. Südafrikas (einschliesslich Madagaskar) und in weiten Teilen Asiens vor. *Vitex lucens* T. Kirk ist auf der Nordinsel von Neuseeland beheimatet.

Vier der genannten Arten werden von den Systematikern aus morphologischen Gründen zum gleichen Subgenus, *Euvitex* Pieper, gerechnet³⁻⁵. Nur *V. lucens* ist nach Pieper⁵

* Herrn Professor Dr. K. Mothes zum 65. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

† Herrn Professor Dr. Moldenke danken wir sehr für die Nachbestimmung des Materials von *Vitex megapota mica*.

¹ H. N. MOLDENKE, *Phytologia* 5, 142 (1955).

² H. N. MOLDENKE, *A résumé of the Verbenaceae, Avicenniaceae, Stilbaceae, Symphoremaceae, and Eriocaulaceae of the world as to valid taxa, geographic distribution and synonymy* (1959).

³ J. C. SCHAUER, Verbenaceae in A. de Candolle, *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*, Paris (1847).

⁴ J. BRIQUET, Verbenaceae in Engler-Prantl, *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, IV, 3a, Leipzig (1897).

⁵ W. PIEPER, *Engl. Bot. Jahrbuch*, 62, Beibl. 141, 1 (1928).

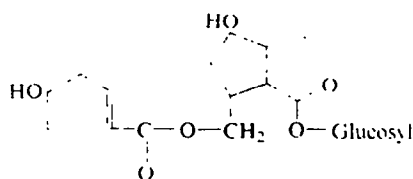
wahrscheinlich zum Subgenus *Chrysomallum* (Dup.Th.) Pieper zu stellen. Von dieser Art wurde nur das Holz geprüft.

Da eine Berücksichtigung aller Stoffgruppen nicht möglich war, mussten wir uns auf einige für die Fragestellung besonders wichtig erscheinende Verbindungstypen beschränken. Hierfür bot sich insbesondere das bisher nur aus der Gattung *Vitex* bekannte, anscheinend für diese spezifische Pseudoindikan (Iridoid) Agnusid (I) an.⁶⁻⁹ (Der Terminus Iridoid sollte anstelle von Pseudoindikan verwendet werden¹⁰). Daneben wurde auf das Iridoid Aucubin (II) geachtet.^{7,8} Die Flavonoide wurden in die Untersuchung einbezogen,^{8,11-13} da auf diese Weise Beziehungen zur Führung von ätherischem Öl studiert werden konnten. Dabei handelt es sich um das nur aus *Vitex* bekannte Casticin (III, 3',5-Dihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxy-flavon), ferner um Orientin und Homoorientin (IV, 3',4',5,7-tetrahydroxy-8(bzw.6)-glucopyranosyl-flavon), sowie um Luteolin-7-glucosid (V, 3',4',5-Trihydroxy-7-glucosyloxy-flavon).

Die konstitutionellen Zusammenhänge zwischen Orientin und Homoorientin sind erst vor kurzem völlig geklärt worden.¹⁴ Weiter berücksichtigten wir ein offensichtlich neuartiges Triterpen (Vitex-Triterpen I). Die Verbindungen wurden zum Teil isoliert. In einigen Fällen haben wir uns mit analytischen Nachweismethoden begnügt.

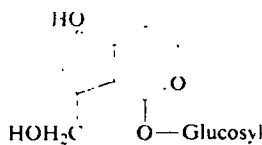
ERGEBNISSE

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, findet sich das Iridoid Agnusid in allen Arten mit Ausnahme von *V. megapotamica*, wo es weder in den Blättern noch im Holz nachgewiesen



(I)

Agnusid⁷ (H. Schmidt, Privatmitteilung)



(II)

Aucubin^{15,16}

⁶ T. P. GHOSE und S. KRISHNA, *J. Indian Chem. Soc.* **13**, 634 (1936).

⁷ E. WINDE und R. HÄNSEL, *Arch. Pharm.* **293**, 556 (1960).

⁸ M. SIRAIT, Diss. FU Berlin (1961).

⁹ R. HÄNSEL, H. RIMPLER und K. D. SCHAAF, *Arch. Pharm.* **297**, 493 (1964).

¹⁰ L. H. BRIGGS, B. F. CAIN, P. W. LE QUESNE und J. N. SHOOLERY, *Tetrahedron Letters* **2**, 69 (1963).

¹¹ M. SIRAIT, H. RIMPLER und R. HÄNSEL, *Experientia* **18**, 72 (1962).

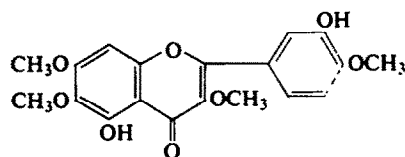
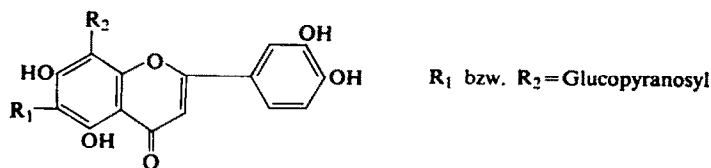
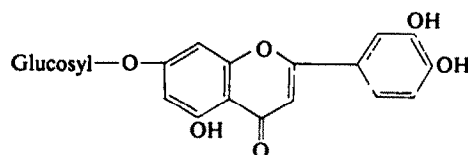
¹² I. BELIC, J. BERGANT-DOLAR und R. A. MORTON, *J. chem. Soc.* 2523 (1961).

¹³ R. HÄNSEL und H. RIMPLER, *Arch. Pharm.* **296**, 598 (1963).

¹⁴ B. H. KOEPPEL, *S. A. Med. J.* **38**, 154 (1964).

¹⁵ S. JUJISE, H. OBARA und H. UDA, *Chem. & Ind.* 289 (1960).

¹⁶ J. GRIMSHAW und H. R. JENNIFER, *Chem. & Ind.* 656 (1960).

(III)
Casticin¹²(IV)
Orientin bzw. Homoorientin^{14,17}(V)
Luteolin-7-glucosid¹⁸

werden konnte. Aucubin zeigt die gleiche Verteilung wie Agnusid. Das lipophile Flavon Casticin ist in den Blättern von *V. agnus-castus*, *V. negundo* und *V. trifolia* vorhanden, fehlt aber bei *V. megapotamica*. Hydrophile Flavone vom Typ der O- bzw. C-Glykoside sind in allen Arten anzutreffen. Vitex-Triterpen I wurde nur in Blättern von *V. megapotamica* gefunden, nicht aber in *V. agnus-castus* oder in *V. lucens* (Holz).

TABELLE 1. VERTEILUNG DER UNTERSUCHTEN SEKUNDÄREN PFLANZENSTOFFE BEI 5 VITEX-ARTEN

Inhaltsstoffe	<i>V. agnus-castus</i>		<i>V. megapotamica</i>		<i>V. negundo</i>	<i>V. trifolia</i>	<i>V. lucens</i>
	Bl	Ho	Bl	Ho	Bl	Bl	Ho
Aucubin	+	+	—	—	+	+	+
Agnusid	+	+	—	—	+	+	+
Casticin	+	—	—	—	+	+	—
Flavon-O- u. C-Glykoside	+	+	+	—	+	+	+
Äth. Öl	+	—	(+)	—	+	+	—
Vitex-Triterpen I	—	—	+	—	—	—	—

Zeichenerklärung: + = vorhanden; (+) = sehr wenig vorhanden; — = nicht vorhanden.
Bl = Blätter; Ho = Holz.

Aus den Resultaten geht hervor, dass *V. megapotamica* eine Sonderstellung einnimmt. Dieser Eindruck verstärkt sich, wenn man das Vorkommen von ätherischem Öl in die

¹⁷ B. H. KOEPPEN und D. G. ROUX, *S. A. Med. J.* **38**, 154 (1964).

¹⁸ H. NAKAMURA, T. OHTA und G. HUKUTI, *Chem. Zentralbl.* **II**, 3801 (1936).

Betrachtung einbezieht. Eine Wasserdampfdestillation der Blätter von *V. megapotamica* lieferte kein ätherisches Öl. Die Blätter der anderen Arten sind mehr oder weniger reich daran.¹⁹ Natürlich ist damit zugleich die Beziehung zu einem morphologischen Merkmal gegeben, denn das ätherische Öl ist in Drüsenhaaren lokalisiert, eine Auszählung unter dem Mikroskop ergibt bei *V. megapotamica* einen geringen Wert im Vergleich mit *V. agnus-castus*.^{1, 18} Es fällt auf, dass sich das besondere Verhalten von *V. megapotamica* nicht auf einen Stoff beschränkt, sondern mehrere Verbindungen verschiedenen Typs betrifft.

Wir haben schon früher²⁰ darauf hingewiesen, dass es für das Verständnis des Vorkommens oder Fehlens bestimmter chemischer Merkmale zweckmässig ist, nicht zu schematisch einzelne Substanzen ins Auge zu fassen, sondern auf Grundtendenzen des Stoffwechsels zu achten. Eine solche Grundtendenz scheint—wie an mehreren Beispielen gezeigt werden konnte—darin zu bestehen, dass Pflanzen, die ätherisches Öl bilden, bestrebt sind, Stoffe anderer Art, die wir üblicherweise nicht zu den "ätherischen Ölen" zählen, mit lipophilen Gruppen zu beladen, beispielsweise die Flavonoide. Wir stellen nun auch in der Gattung *Vitex* eine solche Korrelation fest. Das lipophile Flavon Casticin ($\lambda_{\text{max}} = 0.42$)* findet sich nach unseren Resultaten nur in den Blättern der *Vitex*-Arten, die reichlich ätherisches Öl produzieren. In *V. megapotamica* fehlt diese Verbindung.

Das Ergebnis bestätigt zugleich die Fruchtbarkeit einer Methode, die versucht, stoffwechselphysiologische Zusammenhänge auch in chemotaxonomische Untersuchungen einzubeziehen.

Wenn man die Resultate der vergleichend-phytochemischen Prüfung einiger Vertreter der Gattung *Vitex* überblickt, scheint es, als würde sich in der Verteilung der verschiedenen Produkte des Sekundärstoffwechsels eher eine physiologische Mannigfaltigkeit als die morphologisch-systematische Einheitlichkeit widerspiegeln. Damit ist zugleich auf die Gefahr einer kritiklosen Anwendung chemischer Merkmale zur systematischen Gliederung hingewiesen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Heiztischmikroskop bestimmt und sind nicht korrigiert. Die u.v.-Spektren wurden mit dem Beckmann-Spektrophotometer DU G 2400 aufgenommen. Die Messungen wurden an methanolischen Lösungen bei einer Schichtdicke von 1 cm vorgenommen. Die i.r.-Spektren wurden mit einem Leitz IR-Spektrophotometer aufgenommen. Zur Messung gelangten KBr-Presslinge.

Für die Papierchromatographie wurde das Papier Schleicher und Schüll 2043bM verwendet. Es wurde aufsteigend entwickelt, sofern nichts anderes vermerkt ist. Die Konzentrationsangaben für die Laufmittel beziehen sich auf Volumina (v/v). Für diese Laufmittel werden folgende Abkürzungen benutzt: BEW = Butanol:Essigsäure:Wasser, 4:1:5, Oberphase; PAW = Isopropanol:Ameisensäure:Wasser, 10:2:3; EW = Essigsäure:Wasser.

Die Elementaranalyse und Acetylgruppenbestimmungen wurden im mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Institut für Kohleforschung, Mülheim/Ruhr, durchgeführt.

* Verhältnist der Anzahl Sauerstoff-atome zur Anzahl der Kohlenstoff-atome: ein ungefähres Mass für die Polarität.

¹⁹ Zit. nach E. GILDEMEISTER-FR. HOFMANN, *Die ätherischen Öle*, Band VI, 4. Aufl., Berlin (1961); *Ber. Schimmel* 74, (1894), *Verlag's Land Plantentum te Buitenzorg* 39 (1895), Y. SHINOSAKI, *J. Chem. Ind. (Japan)* 24, 191 (1921), nach *J. Soc. chem. Ind.* A40, 411 (1921); *Ber. Schimmel* 125 (1908)—*Chem. Zentralbl.* 1477 (1909), N. K. BASU und G. B. SING, *Quart. J. Pharm. Pharmacol.* 20, 136 (1947), nach *Schimmel u. Co., Inc., Report*, 59 (1947/48).

²⁰ R. HÄNSEL, *Planta Medica* 10, 361 (1962).

Isolierung und Nachweis der Iridoide Agnusid und Aucubin

(A) Nachweis von Agnusid und Aucubin im Holz von *Vitex agnus-castus* L.

(1) *Probe nach Trim und Hill*²¹ auf Iridoide. Etwa 1 g des getrockneten und fein gepulverten Holzes wurde mit 10 ml Wasser unter Zusatz einer Messerspitze Calciumcarbonat 5 Min gekocht und anschliessend filtriert. Etwa 2 ml des Filtrats wurden mit der gleichen Menge Reagenzlösung (1 ml 0.2% Kupfersulfatlösung/0.5 ml 25% Salzsäure/10 ml Eisessig) versetzt und zum Sieden erhitzt. Nach etwa 1 Min färbte sich die Lösung intensiv blau. Das Auftreten dieser Färbung zeigt die Anwesenheit von Iridoiden an.

(2) *Papierchromatographie*. Je 0.1 ml des nach 1. bereiteten wässrigen Drogenextrakts wurden an Papier mit den Systemen BEW (I) und 5% Natriumchloridlösung (II) chromatographiert. Als Vergleichssubstanzen liefen Aucubin und Agnusid mit. Sprühreagens: 5% methanolische Trichloressigsäure; Nachbehandlung: Kurzes Erhitzen auf 105°. Die Iridoide erscheinen nach dieser Behandlung als schmutzigblaue Flecken. Die Papierchromatogramme des Drogenextraktes zeigten zwei solcher Flecken, deren R_f -Werte mit denen von Agnusid (System I: 0.71, II: 0.69) und Aucubin (System I: 0.40, II: 0.90) übereinstimmten.

(B) Versuche zum Nachweis von Iridoiden in Blättern und Holz von *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke.

(1) *Probe nach Trim und Hill*²¹. Die Probe wurde wie unter A beschrieben ausgeführt. Auch nach längerem Erhitzen mit dem Reagenz zeigten weder der Blatt- noch der Holzextrakt die charakteristische Blaufärbung.

(2) *Papierchromatographie*. Die Papierchromatogramme von Blatt- und Holzextrakten (Laufmittel und Sprühreagenz siehe A) zeigten keine Flecke mit der charakteristischen Farbe der Iridoide.

Isolierung und Nachweis von Flavonoiden

(A) Die Flavonoide von *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke.

(1) *Untersuchung der Blätter; Isolierung von Orientin und Luteolin-7-glucosid*. Die Papierchromatogramme von wässrigen Blattextrakten (Laufmittel BEW) zeigten die Anwesenheit von 3 Flavonoiden: F_1 (R_f 0.50), F_2 (R_f 0.33) und F_3 (R_f 0.49). F_1 und F_2 wurden kristallin erhalten; F_3 wurde durch präparative Papierchromatographie angereichert und dann papierchromatographisch identifiziert.

(a) *Isolierung der Flavone F_1 (Luteolin-7-glucosid) und F_2 (Orientin)*: Das Blattmaterial wurde von Stengelteilen befreit und die Blätter zu einem groben Pulver zerkleinert. Die Ausgangsmenge betrug 1.5 kg Pulver. Die Blätter wurden in 1 l. siedendes Wasser eingetragen und 15 Min am Sieden gehalten. Dann wurde abgepresst und dieser Arbeitsgang noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Filtrate wurden unter vermindertem Druck auf etwa 2 l. eingengt. Durch Dekantieren konnte ein Teil der unlöslichen Begleitstoffe entfernt werden. Ein weiterer Teil wurde durch Ausschütteln mit Petroläther abgetrennt. In einem Perforator wurde der wässrige Extrakt nun solange mit Essigester (60 Stunden) perforiert, bis sich papierchromatographisch keine Flavonoide mehr in der wässrigen Phase nachweisen liessen. Um die extrahierten Stoffe nicht unnötig der Wärme auszusetzen, wurde die Vorlage nach je fünf Stunden gewechselt.

Die vereinigten Essigesterauszüge wurden im Vakuum eingengt und der Rückstand viermal mit je 50 ml kochendem Wasser ausgerührt. Die filtrierten wässrigen Lösungen wurden vereinigt, konzentriert und auf eine Perlonsäule gegeben. Die 50 cm lange Säule hatte eine lichte Weite von 6 cm und war bis zu einer Höhe von 35 cm mit Polyamid (Versuchs-

²¹ A. R. TRIM und R. HILL, *Biochem. J.* 50, 310 (1952).

muster BASF PP 15 SP) gefüllt, das zuvor mit je 3 l. Methanol und Wasser gewaschen worden war.

Chromatographiert wurde mit 80% Methanol, wobei die Auftrennung der einzelnen Zonen im ultravioletten Licht verfolgt werden konnte. Zur Auftrennung über die gesamte Länge der Säule waren 4 l. Chromatographierlösung erforderlich. Nach dieser groben Vortrennung des Pflanzenextraktes wurde die noch feuchte Perlon" wurst" mit Wasserdruck aus der Säule herausgepresst und in die einzelnen, im ultravioletten Licht verschiedenfarbigen Zonen zerlegt. Anschliessend wurde jede Zone mit reinem Methanol eluiert.

Das Eluat der im ultravioletten Licht dunkel erscheinenden, die Flavonoide enthaltenden Zone wurde eingengt und nochmals über eine schmalere Perlonsäule (4 cm lichte Weite, 40 cm Länge) aufgetrennt. Im unteren Teil der Säule trennte sich dabei die bisher einheitlich erschienene Zone in zwei gegeneinander abgegrenzte Teile auf. Die diesen Zonen entsprechenden Eluate wurden getrennt aufgefangen, eingengt und zum Auskristallisieren in den Kühlschrank gestellt.

Die Substanz F_1 wurde dreimal aus 50% Äthanol umkristallisiert und wies dann einen Schmelzpunkt von 258–260 (Zers.) auf. Ausbeute 20 mg. Der Schmelzpunkt wird durch authentisches Luteolin-7-glucosid nicht erniedrigt. Auch das u.v.-Spektrum von F_1 ist mit dem des Luteolin-7-glucosides identisch: λ_{\max} , 350 und 256 nm, ϵ'_{\max} 45.9 bzw. 43.71.

Bei der Chromatographie in drei verschiedenen Laufmitteln verhielten sich die beiden Substanzen ebenfalls gleich; R_f -Werte: BEW 0.50, PAW 0.41, EW (3:7) 0.30.

Das Flavon F_2 wurde zur Umkristallisation in absolutem Äthanol gelöst, bis zur leichten Trübung eingengt und nach Zusatz von einigen Tropfen Wasser bei Zimmertemperatur stehen gelassen (Schmelzpunkt 255–257). Der Schmelzpunkt liegt etwas tiefer als in der Literatur²² angegeben (256–267); wegen der geringen Ausbeute (30 mg) verzichteten wir jedoch auf eine weitere Reinigung. Hinsichtlich der u.v.-Spektren (λ_{\max} , 349 und 257 nm, ϵ'_{\max} 42.7 bzw. 41.4 l. g⁻¹cm⁻¹) und der R_f -Werte in drei verschiedenen Laufmitteln (BEW 0.33, PAW 0.47, EW (1:1) 0.50) stimmten F_2 und authentisches Orientin* genau überein.

(b) Abtrennung und Identifizierung des Flavons F_3 (Homo-Orientin): Das Essigesterperforat des wässerigen Blattextraktes (s. unter a) wurde streifenförmig auf das Chromatographiepapier aufgetragen und absteigend im System BEW entwickelt. Die den Flavonen F_1 und F_3 entsprechende Zone bei R_f 0.5 wurde ausgeschnitten und mit 50% Methanol eluiert. Das Eluat wurde nochmals bandförmig aufgetragen und diesmal mit EW (1:9) entwickelt. Nach Ausschneiden der Zone bei R_f 0.24 und Elution mit 50% Methanol erhielten wir eine chromatographisch reine Lösung von F_3 . Diese Lösung wurde in drei verschiedenen Laufmitteln mit authentischem HOMO-Orientin aus *Vitex agnus-castus*¹³ verglichen. Die R_f -Werte stimmten genau überein: BEW 0.49, PAW 0.40, EW (1:1) 0.67.

(2) Untersuchung des Holzes. Das gepulverte Holz (ca. 10 g) wurde zweimal je $\frac{1}{2}$ Stunde mit je 50 ml 80% Methanol am Rückfluss ausgekocht. Die Extrakte wurden vereinigt und filtriert. Das Filtrat gab weder mit Magnesium und Salzsäure²³ noch mit Zink und Salzsäure²⁴ eine charakteristische Färbung. Auch papierchromatographisch (zweidimensional: BEW, dann EW (1:9)) liessen sich in dem Extrakt keine Flavonoide nachweisen.

* Wir danken Herrn Dr. M. Shimokoriyama, Tokio, für die Überlassung einer Probe Orientin aus *Oxalis cernua*.

²² B. H. KOEPPEN, C. J. B. SMIT und D. G. ROUN, *Biochem. J.* **83**, 507 (1962).

²³ J. SHINODA, *J. Pharm. Soc. (Japan)* **48**, 214 (1928).

²⁴ J. C. PEW, *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 3031 (1948).

Die Flavonoide des Holzes von Vitex agnus castus

(1) *Papierchromatographische Trennung und Anreicherung.* Das grobgepulverte von der Rinde befreite Holz (500 g) wurde zweimal eine halbe Stunde mit der fünffachen Menge 80% Methanol am Rückfluss gekocht und heiss filtriert. Die Filtrate wurden vereinigt, im Vakuum auf 300 ml eingeeengt und zehnmal mit je 50 ml Essigester ausgeschüttelt. Dadurch liessen sich ein grosser Teil des Agnusids und einige andere Verunreinigungen entfernen. Die wässrige Phase wurde mit Ammoniumsulfat gesättigt und die Flavonoide sechsmal mit je 40 ml Butanol ausgeschüttelt. Die Butanolphase wurde mit wenig Wasser gewaschen und zur Trockne eingeeengt. Aus dem schwarzen Rückstand liessen sich mit wenig kaltem Wasser die Flavonoide herauslösen. Die weitere Reinigung und Trennung erfolgte papierchromatographisch:

Dazu wurde die konzentrierte wässrige Lösung als Streifen auf die Startlinien aufgetragen. Die Startlinien befanden sich 7 cm vom oberen Rand auf der Schmalseite der 15 × 50 cm grossen Papiere. Die Entwicklung erfolgte absteigend. Die im u.v.-Licht dunkel erscheinenden Zonen der Flavonoide wurden ausgeschnitten und die Streifen in einer mit dem Solvens gesättigten Kammer solange mit 50% Methanol eluiert, bis die abtropfende Lösung farblos war. Diese Operation wurde viermal nacheinander mit folgenden Laufmitteln durchgeführt: EW (1:9), BEW, EW (1:1), EW (1:1).

(2) *Säurehydrolyse.* Je 1 ml der wässrigen Flavonlösungen wurden mit der gleichen Menge 3 N Salzsäure versetzt und zwei Stunden auf dem Wasserbad am Rückfluss gekocht. Dann wurde mit Natriumacetat auf pH 5 abgepuffert und die Lösung sofort chromatographiert. Es zeigte sich bei beiden Stoffen F_a und F_b , dass die Lösung neben dem Flavonoid eine weitere flavonoide Substanz ähnlicher Polarität enthielt. Eine Substanz, deren R_f -Wert auf ein Aglukon schliessen liesse, konnte nicht nachgewiesen werden. Es war also wahrscheinlich keine Hydrolyse, sondern eine Isomerisierung eingetreten. Die R_f -Werte beider Flavonoide F_a und F_b sowie ihrer Isomerisierungsprodukte S_a und S_b sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

TABELLE 2. R_f -WERTE DER FLAVONOIDE F_a UND F_b , SOWIE IHRER ISOMERISIERUNGSPRODUKTE S_a UND S_b

Laufmittel	R_f -Werte			
	F_a	S_a	F_b	S_b
Essigsäure 10%	0.30	0.15	0.47	0.22
Essigsäure 30%	0.52	0.35	0.60	0.47
Essigsäure 50%	0.60	0.47	0.66	—
BEW (4:1:5)	—	—	0.43	0.16

(3) *Isomerisierung.* Je 0.5 ml der Flavonlösungen wurden wie oben isomerisiert und die Reaktionsprodukte durch präparative Papierchromatographie getrennt. Die Trennung verlief analog der Trennung der Flavonoide bei der Isolierung.

Die Zonen entsprechend den Isomerisierungsprodukten S_a und S_b bei beiden Flavonoiden wurden nach Markierung im u.v.-Licht ausgeschnitten und diese Spaltprodukte nach Elution aus dem Papier abermals den Bedingungen einer Hydrolyse unterworfen. Die sofort anschliessende papierchromatographische Untersuchung zeigte, dass nach Hydrolyse von S_a neben S_a ein zweiter Fleck entstanden war, der mit dem Ausgangsflavonoid F_a übereinstimmte.

Ebenso stimmte nach Hydrolyse von S_b der ausser S_b aufgetretene Fleck mit dem Flavonoid F_b überein. Die Übereinstimmung konnte in verschiedenen Laufmitteln bestätigt werden (s. Tab. 2). Demnach handelt es sich sehr wahrscheinlich bei der beobachteten Umwandlung um ein Isomerisierungsgleichgewicht, wie es für Flavon-C-glykoside charakteristisch zu sein scheint (vergl.^{14, 17, 25-28}).

(4) *U.V.-Spektren.* Da die Verbindungen nicht in kristallisierter Form vorlagen, wurde zur weiteren Charakterisierung die u.v.-Spektroskopie herangezogen. Zur Messung wurde eine geeignete Menge des Eluats --- zu 5 ml mit der entsprechenden Reagenzlösung aufgefüllt. Die Absorptionsspektren wurden in reinem Methanol und unter Zusatz folgender Reagenzien aufgenommen: (a) gesättigte methanolische Natriumacetatlösung wasserfrei, (b) Natriumacetatlösung 0.5%, Borsäure 1% in Methanol, (c) Natriummethylatlösung etwa 0.002 molar in Methanol, (d) Aluminiumchloridlösung 0.5% in Methanol. Die Messung erfolgte bei den Reagenzien (a) und (d) nach 10 Minuten, bei den Reagenzien (b) und (c) nach 20 Minuten.

TABELLE 3. U.V.-SPEKTROPHOTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN DER FLAVONOIDE F_a UND F_b

Lösungsmittel bzw. reagenz	Flavonoid F_a				Flavonoid F_b			
	$\lambda_{\max}(\text{nm})$		$\Delta\lambda_{\max}(\text{nm})$		$\lambda_{\max}(\text{nm})$		$\Delta\lambda_{\max}(\text{nm})$	
Methanol	350	272			333	274		
+ Natriumacetat	400	281	+50	+9	380	283	-47	+9
+ Natr.acet. + Borsäure	378	264	+28	-8	325	278	-8	+4
+ Natriummethylat	412	274	+62	+2	395	280	-62	+8
					330			
+ Aluminiumchlorid	420	278	+70	+6	348	280	+15	+6
					305			

Aufgrund der u.v.-spektren lässt sich keine eindeutige Aussage über die Struktur der Verbindungen machen. Die Spektren von F_b sind zwar denen des Vitexins sehr ähnlich, jedoch lassen sich F_b und Vitexin papierchromatographisch einwandfrei trennen: EW (1:1): Vitexin R_f 0.71, F_b R_f 0.66.

Zusammenfassend. Die Ergebnisse erlauben die Aussage, dass die Flavonoide des Holzes von *Vitex agnus-castus* C-Glykoside vom Typus des Orientins darstellen, dass sie aber mit keinem der bisher in der Literatur beschriebenen C-Glykoside identisch sind. Eine Strukturaufklärung der Flavonoide war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beabsichtigt.

ISOLIERUNG UND NACHWEIS VON VITEX-TRITERPEN 1 (VT₁)

(A) Isolierung aus den Blättern von *Vitex megapota mica* (Spreng.) Moldenke

Beim Einengen des bei der Auftrennung der Flavonoide (s. dort) an Polyamid erhaltenen Vorlaufs fiel ein schwachgelber Lack an, aus dem nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Wasser farblose tafelförmige Kristalle (2.4 g aus 1.5 kg Droge) erhalten werden konnten vom Schmelzpunkt 153-154°. (Gef.: C. 66.49; H. 9.69; O. 23.78. $C_{30}H_{50}O_8$ erfordert:

²⁵ M. K. SEIKEL und T. A. GEISSMAN, *Arch. Biochem. Biophys.* **71**, 17 (1957).

²⁶ L. HORHAMMER, H. WAGNER, H. NIESCHLAG und G. WILDI, *Arch. Pharm.* **292**, 380 (1959).

²⁷ M. K. SEIKEL und A. J. BUSHELL, *J. Org. Chem.* **24**, 1995 (1959).

²⁸ L. H. BRIGGS und R. C. CAMBIE, *Tetrahedron* **3**, 269 (1958).

C, 67·10; H, 9·12; O, 23·78 %). Wird die gleiche Substanz aus Essigester/Methanol umkristallisiert, so fallen feine Nadeln vom Schmelzpunkt 220–222° an. Gef.: C, 66·94; H, 9·20; O, 23·70; akt. H, 1·27; Mol. Gew. (RAST), 504. $C_{30}H_{50}O_8$ erfordert: C, 67·10; H, 9·12; O, 23·78; 7 akt. H, 1·30 %; Mol. Gew. 538·8. $[\alpha]_D^{20} = +69·5$ ($c = 0·9$ in Methanol). U.V.-Spektrum: λ_{max} , 243 nm (ϵ , 13550). I.R.-Spektrum: $\tilde{\nu}_{max}$, 3448, 2967, 2899, 1658, 1471, 1449, 1389, 1321, 1332, 1149, 1058, 1000, 952, 926, 885, 848 cm^{-1} . Reaktion nach Liebermann-Burchard²⁹ Violettfröbung).

Acetylierung (Acetanhydrid/Pyridin): aus 100 mg VT₁ 60 mg farbloser Nadeln vom Schmelzpunkt 143–145° (Gef.: C, 63·88; H, 8·41; O, 27·43; CH_3CO , 24·67. $C_{38}H_{58}O_{12}$ erfordert: C, 64·57; H, 8·27; O, 27·16; $4CH_3CO$, 24·36 %).

(B) Versuche zum Nachweis von VT₁ in Blättern und Holz von *Vitex agnus-castus* L., sowie im Holz von *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke und *Vitex lucens* T. Kirk.

Das Vitex-Triterpen gibt mit konzentrierter Schwefelsäure eine intensive Rotfröbung. Diese Reaktion lässt sich auch zum Nachweis der Substanz in der Droge benutzen: Übergießt man etwas gepulvertes Drogenmaterial mit 80 % Schwefelsäure, so fröbt sich die Lösung kirschrot; die Intensität dieser Fröbung ist konzentrationsabhängig. Die Reaktion fällt nur bei den Blättern von *Vitex megapotamica* positiv aus; Blätter und Holz von *Vitex agnus-castus* sowie Holz von *Vitex megapotamica* und *Vitex lucens* geben dagegen keine Rotfröbung mit dem Reagenz.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON ÄTHERISCHEM ÖL

(A) Wasserdampfdestillation der Blätter von *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke

200 g Droge wurde grob gepulvert und nach der Vorschrift des DAB VI einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Das Destillat (~ 200 ml) wurde mit 60 g Natriumchlorid versetzt und dreimal mit je 20 ml Pentan ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Pentans verblieb kein wägbarer Rückstand.

(B) Elektive Anföbung und Auszählung der Drüsenhaare auf den Blattunterseiten von *Vitex agnus-castus* L. und *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke

(1) Anföbung der Drüsenhaare mit Sudan III—Lösung. 50 g Sudan III wurden in 10 ml Aethanol unter leichtem Erwärmen gelöst, 50 ml Glyzerin hinzugefügt und die Lösung zum Sieden erhitzt. Die zu untersuchenden Blätter wurden 5 Min in dieser Lösung gekocht, mit Wasser abgespült und sofort mikroskopiert.

(2) Auszählung der Drüsenhaare. Bei beiden Arten wurden die "kleeblattartigen" Drüsenhaare ausgezählt. Die Zählung erfolgte mit einem Netzkular. Bei jeder Art wurden an 6 verschiedenen Blättern je zwei Messungen durchgeführt. Der arithmetische Mittelwert dieser 12 Messungen betrug für *V. megapotamica* 3·44 Drüsenhaare/mm², für *V. agnus-castus* 61·1 Drüsenhaare/mm²; das entspricht einem Verhältnis von 1:18.

²⁹ M. STEINER und H. HOLZEM in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* III, 64, Springer Verlag, Berlin (Edited by K. PAECH und M. V. TRACEY) (1961).