

SHORT COMMUNICATION

ÜBER FLAVON- UND ANTHRACHINON-FARBSTOFFE VON *DIGITALIS*-ARTEN—I.

ISOLIERUNG EINES NEUEN ANTHRACHINONFARBSTOFFES AUS DEN BLÄTTERN VON *DIGITALIS VIRIDIFLORA*

S. IMRE

Lehrstuhl für analytische Chemie der pharmazeutischen Fakultät der Universität Istanbul

(Received 5 June 1968)

Zusammenfassung—Aus *Digitalis viridiflora* Lindl. wurde ein bisher nicht bekannter Anthrachinonfarbstoff isoliert und seine Struktur durch Elementaranalyse und mit Hilfe der i.r.- und NMR-Spektroskopie als ein 1,6-(oder 1,7-)Dihydroxy-3-methylanthrachinon aufgeklärt.

Abstract—A new anthraquinone was isolated from the leaves of *Digitalis viridiflora* Lindl. and its structure was found to be 1,6-(or 1,7-)dihydroxy-3-methylanthrachinone by means of elementary analysis, i.r.- and NMR-spectrophotometry.

DER ERSTE Flavonfarbstoff von *Digitalis*-Arten wurde im Jahre 1899 von Fleischer¹ aus den Blättern von *Digitalis purpurea* gewonnen und als Digitoflavan bezeichnet. Einige Jahre später konnte seine Identität mit dem bekannten 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon (Luteolin) festgestellt werden.² In der Zwischenzeit wurden isoliert: aus der gleichen Pflanze das Luteolin-7-glucosid,³ aus *Digitalis thapsi* das 6,4'-Dihydroxy-3,5,7,8-tetramethoxyflavon⁴ (Thapsin=Calycopterin aus *Calycopteris floribunda*^{5,6}), aus *Digitalis lanata* Luteolin, 5,6,7,4'-Tetrahydroxyflavon (Scutellarein) und das 4'-Methoxyscutellarein⁷ ferner 5,7,4'-Trihydroxy-6,3'-dimethoxyflavon⁸ und 5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon⁹ sowie aus *Digitalis purpurea* das 5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4',5'-hexamethoxyflavon (Digicitrin).¹⁰

Der einzige bisher in *Digitalis*-Arten aufgefundene Anthrachinonfarbstoff ist das *Digitolutein*. Es wurde erstmals im Jahre 1899 von Adrian und Trillat¹¹ aus den Blättern von *Digitalis lutea* isoliert, später noch einmal von Paris¹² auch in *Digitalis purpurea* aufgefunden

¹ F. FLEISCHER und E. FROMM, *Chem. Ber.* **32**, 1184 (1899).

² E. DILLER und St. v. KOSTANECKI, *Chem. Ber.* **34**, 1453 (1901); H. KLIANI und O. MAYER, *Chem. Ber.* **34**, 3577 (1901).

³ H. NAKAMURA, T. OHTA und G. HUKUTI, *J. Pharm. Soc. Japan* **56**, 107 (1936); *Chem. Zbl.* **2**, 3801 (1936).

⁴ W. KARRER, *Helv. Chim. Acta* **17**, 1560 (1934).

⁵ N. A. RATNAGRISWARAN, K. B. SEHRA und K. VENKATARAMAN, *Biochem. J.* **28**, 1964 (1934); *Chem. Abstr.* **29**, 2534 (1935).

⁶ W. KARRER und K. VENKATARAMAN, *Nature, Lond.* **135**, 878 (1935).

⁷ S. RANGASWAMI und V. E. RAO, *Proc. Indian Acad. Sci.* **54A**, 51 (1961).

⁸ J. W. APSIMON, N. B. HAYNES, K. Y. SIM und W. B. WHALLEY, *J. Chem. Soc.* 3780 (1963).

⁹ G. O. P. DOHERTY, N. B. HAYNES und W. B. WHALLEY, *J. Chem. Soc.* 5577 (1963).

¹⁰ W. MEIER und A. FÜRST, *Helv. Chim. Acta* **45**, 232 (1962).

¹¹ ADRIAN und A. TRILLAT, *Compt. Rend.* **129**, 889 (1899); *Chem. Zbl.* **1**, 207 (1900).

¹² R. PARIS, *Compt. Rend.* **238**, 932 (1954).

und seine Struktur bald darauf von Janot und Mitarb.¹³ als ein 1-Methoxy-2-hydroxy-3-methylanthrachinon (I) aufgeklärt.

Im Rahmen einer systematischen Untersuchung über die phenolischen Inhaltsstoffe von *Digitalis*-Arten, die in der Türkei wildwachsend vorkommen, haben wir in *Digitalis viridiflora* Lindl., einer in der Türkei neu aufgefundenen *Digitalis*-Art,¹⁴ eine Reihe von Verbindungen nachweisen können, die nach ihrem chromatographischen Verhalten in die Gruppe der Anthrachinone gehören mussten. Nachfolgend beschreiben wir die Reinisolierung und Strukturaufklärung eines der insgesamt vier in *Digitalis viridiflora* nachweisbaren Anthrachinone.

ERGEBNISSE

Extraktion und Isolierung von Anthrachinon A₁

Digitalis viridiflora kommt vereinzelt wildwachsend im IstrancaGebirge (Demirköy/Kirkclareli) zusammen mit *Digitalis ferruginea* vor. Das Blattmaterial wurde zur Blütezeit Mitte Juli gesammelt, im Schatten getrocknet und als grobes Pulver in der Kälte mehrmals mit Methanol extrahiert. Nach Entfernung des Methanols nahmen wir in Wasser (I) auf und schüttelten nacheinander mit Petroläther (II), Benzol (III) und schliesslich mit Äther (IV) aus. Die chromatographische Überprüfung der einzelnen Extrakte an Polyamid-Dünnsschichtplatten brachte folgendes Ergebnis: Die Petrolätherausschüttelung war frei von Flavon- und Anthrachinonfarbstoffen. Die Benzolphase enthielt vier Anthrachinonverbindungen (A₁, A₂, A₃, A₄), die in u.v.-Licht orange fluoreszierten und sich mit Kalilauge kirschartig anfärbten. A₄ zeigte gleiche Laufhöhe wie authentisches Digitolstein. Der Ätherextrakt lieferte 4 Flecke (F₁, F₂, F₃, F₄), die mit Aluminiumchlorid und bas. Bleiacetat positive Flavonreaktionen gaben.

Zur Isolierung des in höchster Konzentration vorliegenden Anthrachinons (A₁) entzogen wir das Anthrachinon der Benzolphase mit Kalilauge, säuersten an und extrahierten erneut mit Benzol. Anschliessende Säulenchromatographie an Polyamid mit Methanol lieferte aus den mittleren und letzten Fraktionen orange gefärbte nadelförmige Kristalle, die nach Sublimation bei 254–255° schmolzen.

Strukturaufklärung von Anthrachinon A₁

Wie die chromatographische Untersuchung und der Schmelzpunktsvergleich ergaben, war eine Identität von A₁ mit Digitolstein (Schmp. = 222° bzw. 224–228°^{11, 12}) auszuschliessen. Chromatographisch verhielt sich A₁ ähnlich wie die beiden 1,8-Dihydroxyanthrachinone Chrysophanol und Rheum-Emodin. Wir acetylierten in üblicher Weise und erhielten ein Diacetat vom Schmp. = 190°. Die Elementaranalysen sprachen für das Vorliegen eines bisher unbekannten Dihydroxymonomethylanthrachinons. Da im i.r.-Spektrum von A₁ eine freie und eine chelierte Karbonylbande (1665 cm⁻¹ (frei), 1640 cm⁻¹ (chel.)) erscheinen, muss eine der beiden Hydroxylgruppen α -ständig, die zweite β -ständig angeordnet sein.¹⁵ Über die Position der zweiten OH-Gruppe und der C-Methylgruppe gibt das NMR-Spektrum des A₁-Acetates (siehe Abb. 1) folgende Auskunft: Die C-Methylgruppe erscheint als ein Singulett bei δ = 2,52 und damit an der gleichen Stelle wie man sie in den 3-Methylanthrachinonen vorfindet. Da die Signale für die beiden Acetylgruppen bei δ = 2,49 und δ = 2,37 liegen, kann

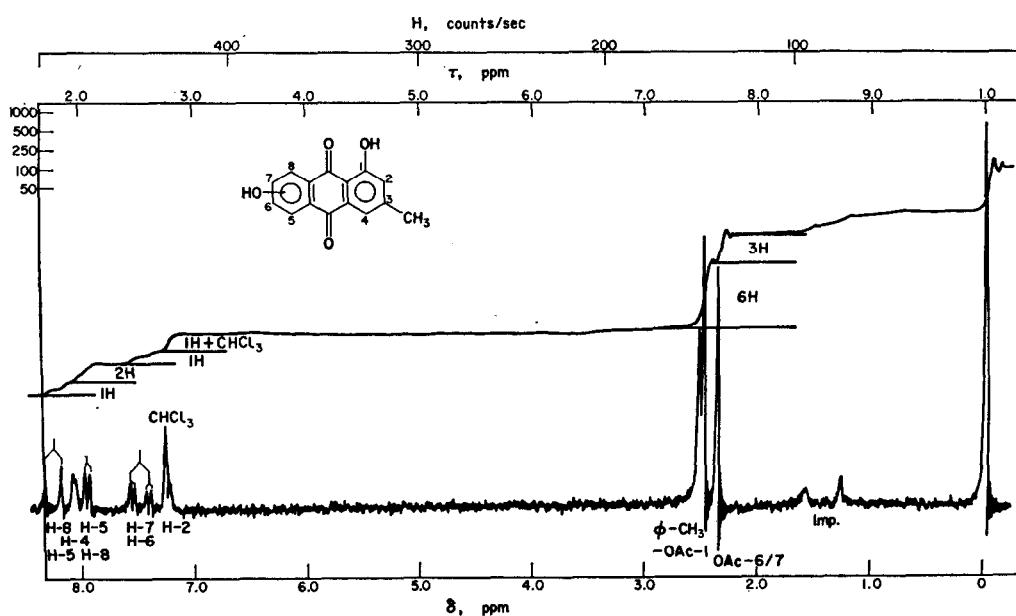
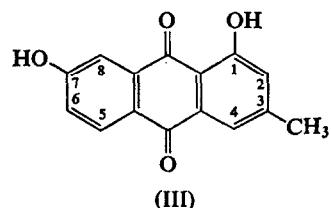
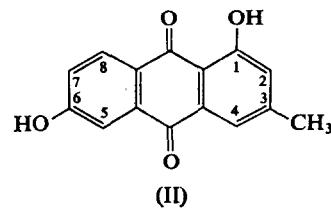
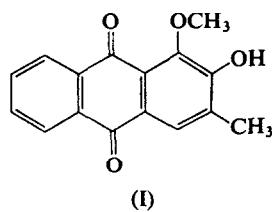
¹³ M. M. JANOT, J. CHABASSE-MASSONNEAU, P. DE GRAEVE und R. GOUTAREL, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 108 (1955).

¹⁴ T. BAYTOP, *Istanbul Univ. Tip. Fak. Mec.* 22, 1364 (1959).

¹⁵ H. BLOMM, L. H. BRIGGS und B. CLEVERLEY, *J. Chem. Soc.* 178 (1959).

nur eine Acetylgruppe α -ständig zur Carbonylgruppe angeordnet sein. Im Bereich der aromatischen Protonen findet man Duplette für das C₂- und C₄-Proton bei $\delta=7,22$ bzw. $\delta=8,05$. Für die Position der zweiten OH-Gruppen bleibt somit nur noch C₆ oder C₇. Die von den drei restlichen Protonen stammenden Signale mit Zentrum bei $\delta=8,25$, 7,95 und 7,48 zeigen die charakteristischen *ortho*- und *meta*-Kopplungen einer 5,87 oder 5,86-Protonen-Kombination. Eine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten wird zur Zeit auf synthetischem Wege versucht.

Für das neue Anthrachinon aus *Digitalis viridiflora* kann daher die Struktur eines 1,6-(oder 1,7-)Dihydroxy-3-Methylantrachinons (II und III) geschrieben werden. Aus bioogenetischen Gründen ist Formel (II) wahrscheinlicher als Formel (III).

ABB. 1. NMR-SPEKTRUM VON ANTHRACHINON A₁-ACETAT

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Schmelzpunktsapparat nach Dr. Tottoli der Fa. Büchi/Schweiz bestimmt. Sie sind unkorrigiert. Für die Dünnschichtchromatographie wurde MN-Polyamid-Pulver der Fa. Macherey-Nagel und Co., Düren/Rhein verwendet. Zur Entwicklung diente reines Methanol. Die Säulenchromatographie erfolgte auf einem Polyamidpulver der Korngrösse 30–80 μ , das im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München nach einem speziellen Verfahren aus Ultramid-B 3 (BASF-Ludwigshafen/Rhein) hergestellt worden war. Die u.v.-, i.r.- und NMR-Spektren wurden mit den Geräten "Zeiss Spektrophotometer M 4 Q II, Beckman Spectrophotometer i.r.-8 und Kernresonanzspektrophotometer Varian-A 60" aufgenommen.

Isolierung der Anthrachinonverbindung (A₁)

800 g grob gemahlene Blätter von *Digitalis viridiflora* Lindl. (gesammelt im Sommer 1966 in der Gegend Demirköy/Kirkclareli) wurden 25 Std. lang bei Zimmertemperatur in mehreren Anteilen mit insgesamt 12 L. 90% igem Methanol unter ständigem Rühren extrahiert. Wir vereinigten die Extrakte und destillierten im Vakuum bei 50° das Methanol ab, sodass ca. 500 ml eines rein wässrigen Extraktes zurückblieben (I). Der Extrakt I wurde anschliessend zunächst dreimal mit je 500 ml Petroläther (II), dann mit Benzol (3 \times 500 ml = III) und schliesslich mit Äther (3 \times 500 ml = IV) ausgeschüttelt. Nach dem Abdestillieren der Lösungsmittel blieben von II 19,9 g, von III 4,2 g und von IV 2,9 g schwarzbraun gefärbte klebrige Rückstände zurück.

Zur Anreicherung des Anthrachinons A₁ lösten wir 4,2 g von Extrakt III in 150 ml Benzol und schüttelten die org. Phase 3 mal mit je 100 ml einer 5% igen wässrigen KOH-Lösung aus. Die vereinigten KOH-Lösungen wurden mit HCl angesäuert und dann wiederum 3 mal mit je 100 ml Benzol ausgeschüttelt. Die vereinigten Benzol-Ausschüttelungen wurden mit Wasser säurefrei gewaschen. Nach dem Abdestillieren des Benzols verblieb ein dunkelbrauner Rückstand (1,6 g). Dieser wurde in 10 ml Methanol gelöst und an einer Polyamidsäule (4 \times 30 cm) chromatographiert. Als Elutionsmittel diente reines Methanol (Abtropfgeschwindigkeit: 25 Tropfen pro Minute). Nach 300 ml Vorlauf, der verworfen wurde, gewannen wir insgesamt 28 Fraktionen á 25 ml. Die Fraktionen 2 bis 9 lieferten nur Milligramm-Mengen und bestanden aus einer Mischung von A₁, A₂, A₃ und A₄. Die Fraktionen 10–28 enthielten die Hauptmengen an Substanz A₁. Wir vereinigten diese Fraktionen und gewannen beim Einengen orange gefärbte Kristallnadeln. Die Rohkristalle wurden zweimal aus Methanol umkristallisiert (Ausbeute ca. 20 mg). Nach Sublimation bei 220° schmolzen diese scharf bei 254–255°. (Gef. C, 71,01; H, 3,83. Ber. für C₁₅H₁₀O₄: C, 70,86; H, 3,96%). Die Kristalle lösen sich in wässrigen Kaliumhydroxyd- und Kaliumkarbonatlösung mit kirschroter Farbe.

U.v.-Spektrum i. Methanol: Max₁=268 nm ($\epsilon=15618$), Max₂=412 nm ($\epsilon=3721$). I.r.-Spektrum (in KBr): OH—3445 cm⁻¹, C=O nicht chel. 1665 cm⁻¹, C=O chel. 1640 cm⁻¹, $\text{>C=C<} 1600 \text{ cm}^{-1}$. Polyamid-Chr. Laufmittel Methanol: R_f=0,13.

Anthrachinon-Diacetat

Die hellgelben, nadelförmigen Kristalle zeigten einen Schmp. von 190° (Gef. C, 67,12; H, 4,20; CH₃CO, 25,22. Ber. für C₁₉H₁₄O₆ (2 Acetyl): C, 67,45; H, 4,17; CH₃CO, 24,44%). NMR: $\delta=8,25$ (H8 oder H5, Dubl. $J_o=8$ c/s), $\delta=8,05$ (H4, Dubl. breit $J_m=1,5$ c/s), $\delta=7,95$ (H5 oder H8, Dubl. $J_m=2$ c/s), $\delta=7,48$ (H7 oder H6, Quartett mit $J_m=2,5$ c/s und $J_o=8$ c/s), $\delta=7,22$ (H2, Dubl. $J_m=1,0$ c/s), $\delta=2,52$ (CH₃—Sing.), $\delta=2,49$ (Acetyl; Cl—OH), $\delta=2,37$ (Acetyl C6—oder C7—OH).

Danksagung—Diese Arbeit wurde zum Teil während eines dreimonatigen Aufenthaltes am Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München durchgeführt. Für die Gewährung eines Stipendiums bin ich dem Deutschen Akademischen Austauschdienst zu grossem Dank verpflichtet. Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes habe ich Herrn Professor Dr. L. Hörhammer und für wertvolle Hinweise und Diskussionen Herrn Professor Dr. H. Wagner herzlich zu danken.