

SHORT COMMUNICATION

VERBINDUNGEN AUS DER AUCUBIN-GRUPPE BEI *GLOBULARIA CORDIFOLIA*

HELMUT KINZEL und HANNELORE STUMMERER-SCHMID

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien, Österreich

(Received 1 January 1970)

Abstract—*Globularia cordifolia* contains large amounts of substances of the aucubin type. We identified one of them as asperulosid. The chromatographic and spectrographic data of two others which so far are unidentified are presented. From the results of alkali degradation one might be an aucubin ester of the type of agnusid or lyanthosalin.

Zusammenfassung—*Globularia cordifolia* enthält grosse Quantitäten von Substanzen aus der Aucubin-Gruppe. Eine der 3 nachgewiesenen Hauptkomponenten konnte als Asperulin identifiziert werden. Für die beiden anderen werden chromatographische und spektrographische Daten vorgelegt. Eine von diesen könnte, auf Grund der Ergebnisse des Alkali-Abbaues, ein Aucubin-Ester vom Typ des Agnusid oder Lyanthosalin sein, die andere muss ihr konstitutionell sehr nahe stehen.

EINLEITUNG

DER XEROPHYT *Globularia cordifolia* wächst reichlich auf den Kalkbergen südwestlich von Wien. Die Pflanze fiel den Ökologen schon seit langem durch ihre aussergewöhnlich hohen osmotischen Werte auf. Die an Blattzellen mit mikroskopischer (grenzplasmolytischer) Methode ermittelten Werte entsprechen bis zu 1,6 mol Glucose.¹ Schmid² analysierte Wasseraeekte aus den Blättern dieser Species im Hinblick auf die Zusammensetzung des Zellsaftes. Dabei fielen auf Papierchromatogrammen der (mit Hilfe von Ionenaustauschern abgetrennten) Zuckerfraktion neben den Flecken der verbreiteten Mono- und Oligo-saccharide einige sehr intensive Flecken mit hohen R_f -Werten auf, die mit keinem der bekannten Zucker in Zusammenhang zu bringen waren. Aus den beobachteten Farbreaktionen vermuteten wir, dass es sich um Glykoside aus der Aucubingruppe handle. Da, soweit aus der Fleckengrösse zu schliessen war, diese Komponenten ihrer Menge nach die vorhandenen Zucker bei weitem übertreffen, so lag es nahe, eine Identifikation zu versuchen.

ERGEBNISSE

Im fraglichen Bereich der Papier- und Dünnschichtchromatogramme zeigten sich drei Hauptkomponenten, die in Anlehnung an Schmid² mit den Ziffern 2, 3 und 4 bezeichnet wurden (Schmid's Komponente 1 war in zu geringer Menge vorhanden). Zwischen 3 und 4 erschien mit manchen Farbreagenzien eine weitere Komponente ("3a"), die nur durch Kombination zweier verschiedener Fliessmittel sauber von 3 und 4 abzutrennen war. Die Tabellen 1 und 2 geben die chromatographischen Daten wieder. Auf Grund der Farbreaktionen und des R_f -Wertes in Fliessmittel B (Nr. I bei Wieffering³) war zu vermuten, dass die Komponente 2 mit Asperulin identisch sei. Die anderen Komponenten stimmten in ihren

¹ H. MAYER, *Verhandl. Zool. Botan. Ges. Wien* 93, 120 (1953).

² H. SCHMID, Dissertation, Wien (1968).

³ J. H. WIEFFERING, *Phytochem.* 5, 1053 (1966).

TABELLE 1. R_f -WERTE (RICHTWERTE)

Komponente	Papier Fließmittel		Dünnsschicht Fließmittel
	A	B	C
2	0,56	0,53	0,60
3	0,62	0,59	0,70
3a	0,66	0,49	
4	0,69	0,71	0,76

TABELLE 2. FARBREACTIONEN

Komponente	Anilinphthalat	Anisaldehyd	SbCl ₃	Dinitrobenzoësäure	Trichloressigsäure
2	0	blau	blau	0	0
3	grau	rot-braun	grau-braun	0	blau
3a		gelb			
4	grau	rot-braun	rot-braun	0	violett

TABELLE 3. DÜNNSCHEITCHROMATOGRAMM MIT FLIESSMITTEL C UND FARBREACTION MIT SbCl₃

R_f -Wert	Komponente	Beobachtete Flecken nach Auftragen von:		
		unbehandeltem Extrakt	mit NaOH behandeltem Extrakt	Aucubin
0,84	S4	braun	0	0
0,79	Z4	0	gelb	0
0,74	S3	graubraun	schwach braun	0
0,70	S2	blau	0	0
0,62	Z3	0	blau	0
0,60	Z2	schwach braun	stark braun	braun
0,51	Z1	schwach braun	intensiv braun	0

S2-S4: Untersuchte Substanzen.

Z1-Z4: Zersetzungspprodukte.

Farbreaktionen mit keiner der von Wiegerring angegebenen Verbindungen überein. Daher wurde zur Gewinnung spektrographischer Daten geschritten (vgl. den experimentellen Teil).

Für die Komponente 2 erhärtete das u.v.-Spektrum die Annahme, dass es sich um Asperulin (= Asperulosid) handle. Nach Dean⁴ (p. 130) hat diese Verbindung ihr Maximum bei 235 nm. Die u.v.-Spektren der Komponenten 3 und 4 sind einander so ähnlich, dass eine enge Verwandtschaft zwischen ihnen angenommen werden muss. Beide zeigen ein Hauptmaximum bei 230 nm und zwei schwache Maxima (erst bei höheren Konzentrationen sichtbar) bei 274 und 281 nm.

Nur von der Komponente 3 konnte ein i.r.-Spektrum gewonnen werden. Es zeigte Maxima bei 1712, 1546, 1449, 1316, 1272, 953, 862 und 709 cm⁻¹.

Bei der zur Untersuchung des Alkali-Abbaus durchgeföhrten Versuchsreihe waren auf

⁴ F. M. DEAN, *Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds*, Butterworths, London (1963).

den Chromatogrammen neben den drei besprochenen Komponenten (S2, S3, S4) noch einige Zersetzungspprodukte (Z1-Z4) zu sehen. Schon am unbehandelten Extrakt (der inzwischen etwas gealtert war) tauchte nun ein Fleck (Z2) in der Position des Aucubin auf, neben einem weiteren Zersetzungspprodukt. Der alkali-behandelte Extrakt enthielt 4 Zersetzungspprodukte. Die Substanz 2 war ganz verschwunden, was ihre Identität mit Asperulin sicherstellt. S3 war ebenfalls nahezu, S4 war völlig verschwunden. Da das in grosser Menge vorliegende Zersetzungspprodukt Z2 chromatographisch mit Aucubin übereinstimmt und da beim Alkali-Abbau des Asperulin kein Aucubin entstehen kann, so ist zu vermuten, dass S3 oder S4 ein Ester des Aucubin etwa von der Art des Agnusid⁵ oder des jüngst beschriebenen Lyanthosalin⁶ ist. Die andere der beiden Substanzen muss mit dieser eng verwandt sein, wie das u.v.-Spektrum beweist.

Hingegen ist es nach den vorliegenden Untersuchungen ungewiss, ob in der lebenden Pflanze freies Aucubin enthalten war. In dem aus den gefriergetrockneten Blättern frisch hergestellten Extrakt war kein Fleck in der Position des Aucubin nachweisbar, erst im gealterten Extrakt tauchte ein solcher auf.

Hervorzuheben ist nochmals die grosse Quantität der betrachteten Verbindungen, die die gleichzeitig vorhandenen Zucker bei weitem übertrifft und so wesentlich zu dem hohen osmotischen Wert der Pflanze beiträgt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Blätter von *Globularia cordifolia* wurden gefriergetrocknet und pulverisiert. 10 g des Pulvers wurden mit 100 ml siedenden H₂O übergossen, aufgekocht und filtriert. Das Filtrat wurde mit der drei fachen Menge Äthanol versetzt, vom ausgeschiedenen Niederschlag abfiltriert und auf wenige ml eingeengt.

Papierchromatographie. Papier: Schleicher & Schüll 2043 b mit: A, n-BuOH-Pyridin-Benzol-H₂O, 5:3:1:3 (v/v);⁷ B, n-BuOH-Essigsäure-H₂O, 4:1:5 (v/v).⁸ Dünnschichtchromatographie: Sorptionsmittel: Kieselgel G und Kieselgel H (Merck) mit etwa gleichen Resultaten mit: C, Essigsäure-H₂O-Äthylacetat-n-BuOH, 125:125:150:200 (v/v);⁹ D, CHCl₃-MeOH, 8:2 (v/v).⁹

Farbreaktionen. (1) Anilinphthalat, (2) SbCl₃ in Chloroform, (3) Anisaldehyd-H₂SO₄, (4) KOH-Dinitrobenzoësäure, (5) Trichloressigsäure. Die Farreaktionen wurden zumeist der Arbeit von Wieffering³ entnommen. Beim Reagens 5 ergibt sich eine kleine Unstimmigkeit: Wieffering gibt in der Reagenzienliste p. 1058 Trichloressigsäure, bei Tabelle 4 (p. 1060) aber unter dem gleichen Kentbuchstaben Trifluoressigsäure an. Wir verwendeten die erstere. Die Referenzsubstanz Aucubin wurde von der Firma Roth/Karlsruhe bezogen.

Zur Reinigung der einzelnen Komponenten zum Zwecke der Aufnahme von Spektren wurde die Dünnschichtchromatographie benutzt. Der Extrakt aus *Globularia* wurde auf Kieselgel G—Platten strichförmig aufgetragen und mit dem Gemisch C entwickelt. Nach dem Besprühen mit SbCl₃ in einem Randstreifen wurden die Zonen der Substanzen S2-S4 ausgekratzt und mit MeOH eluiert. Die noch unreinen drei Komponenten wurden nun auf je eine neue Dünnschichtplatte aufgetragen, mit Fliessmittel D entwickelt und, wie oben beschrieben, lokalisiert und eluiert. An diesen Lösungen wurden nun die u.v.-Spektren aufgenommen (Gerät: Leitz-Unicam SP 800).

I.r.-Spektren. Aus dem Abdampfrückstand der oben beschriebenen Eluate wurden KBr-Mikropresslinge hergestellt und diese in Gerät Beckman IR-8 (mit "beam condenser") vermessen.

Alkali-Abbau. In Anlehnung an³ durch Zusatz von 0,1 ml 1 N NaOH zu 0,3 ml des Extraktes und Stehenlassen über Nacht bei 20°.

Anerkennung—Wir danken der Österreichischen Nationalbank für eine Subvention aus ihrem Jubiläumsfond. Der erstgenannte Autor dankt seiner lieben Frau für ihre treue Mitarbeit und Herrn Professor Dr. H. Grisebach (Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Universität Freiburg i.B.) für die Möglichkeit, einen Teil dieser Untersuchung als Gast an seinem Institut durchzuführen.

⁵ E. C. BATE-SMITH und T. SWAIN, in *Comparative Phytochemistry* (edited by T. SWAIN), Academic Press, London (1966).

⁶ L. H. FIKNERSCHER, R. HEGNAUER und H. W. L. RUITJGROK, *Pharm. Weekblad* 104, 561 (1969).

⁷ J. M. HAIS und K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, Vol. I, 2, Aufl., p. 350, G. Fischer, Jena (1963).

⁸ M. KOCH, M. PLAT, J. LEHEN und M. M. JANOT, *Bull. Soc. Chim. Franc.* 403 (1964).

⁹ Dr. ACHENBACH, Freiburg (persönliche Mitteilung).