

HANS BROCKMANN und WALTER SANNE

ZUR KENNTNIS DES HYPERICINS UND PSEUDO-HYPERICINS

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 29. Juli 1957)

Bei einer Untersuchung über die Verbreitung von Hypericin bei *Hypericum*-Arten wurde ein neuer, dem Hypericin sehr ähnlicher Farbstoff, das *Pseudo-hypericin* aufgefunden. Es kann im Ring-Papierchromatogramm von Hypericin getrennt werden. Einige der untersuchten *Hypericum*-Arten bilden Pseudo-hypericin neben Hypericin, andere nur Pseudo-hypericin und eine einzige – *Hypericum hirsutum* – allein Hypericin. — Aus *Hypericum hirsutum* wurde zum ersten Mal pseudo-hypericinfreies, kristallisiertes Hypericin gewonnen und durch verschiedene Derivate charakterisiert.

Nach Untersuchungen unseres Arbeitskreises hat das zuerst aus *Hypericum perforatum* isolierte, rote, photodynamisch wirksame Hypericin die Konstitution¹⁾ und entsteht in der Pflanze offenbar durch oxydative Verknüpfung von 2 Moll. Emodin-anthranol bzw. Emodin-antron²⁾. Da die Muttersubstanz des Hypericins somit der Klasse der Hydroxy-anthrachinone nahesteht und Hydroxy-anthrachinone von Mikroorganismen und höheren Pflanzen in mannigfacher Abwandlung aufgebaut werden können, lag die Frage nahe, ob ähnliche Variationen auch bei Farbstoffen vom Typ des Hypericins vorkommen können; oder anders ausgedrückt, ob sich bei den mehr als 200 Arten der Gattung *Hypericaceae* noch andere, dem Hypericin ähnliche Naphthodianthon-Farbstoffe finden lassen. Um diese Frage zu beantworten, muß man möglichst viele *Hypericum*-Arten auf rote, rot fluoreszierende Farbstoffe hin untersuchen, bei positivem Befund die Farbstoffe isolieren und sie mit Hypericin aus *Hypericum perforatum* vergleichen.

Als wir mit Versuchen in dieser Richtung begannen, war über das Vorkommen von Hypericin oder hypericin-ähnlichen Farbstoffen bei anderen *Hypericum*-Arten wenig bekannt.

Chemisch war Hypericin außer in *Hypericum perforatum* nur in *Hypericum hirsutum*³⁾ nachgewiesen, während als biologischer Nachweis für Hypericin oder hypericin-ähnliche Farbstoffe in *Hypericum crispum*, *Hypericum ethiopicum* und *Hypericum leucoptychodes* die Beobachtung⁴⁾ gelten konnte, daß nach Verfütterung dieser *Hypericum*-Arten bei Schafen, Kühen oder Pferden die als „Hypericismus“ bezeichneten Lichtschäden auftreten.

Für unsere Untersuchungen standen uns außer *H. perforatum* zweiundzwanzig andere *Hypericum*-Arten zur Verfügung. In vierzehn von ihnen fanden wir roten, rot fluoreszierenden Farbstoff mit dem Absorptionsspektrum des Hypericins. Etwa

¹⁾ H. BROCKMANN, E. H. v. FALKENHAUSEN, R. NEEFF, A. DORLARS und G. BUDDE, Chem. Ber. **84**, 865 [1951].

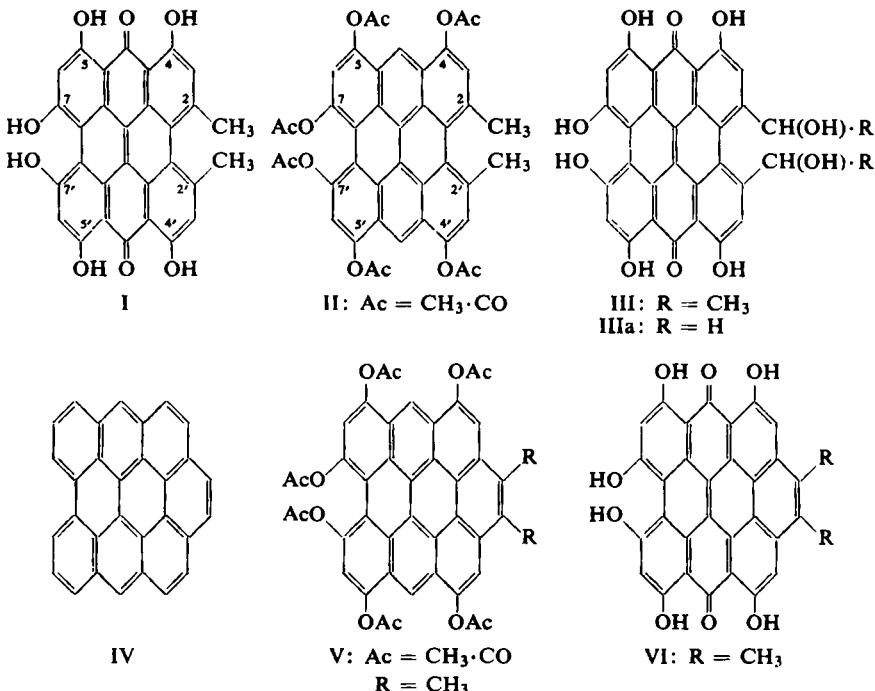
²⁾ H. BROCKMANN und W. SANNE, Naturwissenschaften **40**, 509 [1953].

³⁾ H. BROCKMANN, M. N. HASCHAD, K. MAIER und F. POHL, Liebigs Ann. Chem. **553**, 1 [1942].

⁴⁾ Vgl. H. F. BLUM, Photodynamic Action and Diseases caused by Light, S. 137, Reinhold Publishing Corporation, New York 1944.

gleichzeitig und unabhängig von uns haben A. VAN DER KUY und R. HEGNAUER⁵⁾ die Verbreitung von Hypericin bei *Hypericum*-Arten untersucht und in zwölf Arten – sechs davon solche, die auch wir prüften – roten Farbstoff mit Hypericin-Spektrum festgestellt.

Nachdem somit in insgesamt einundzwanzig *Hypericum*-Arten roter Farbstoff mit Hypericin-Spektrum nachgewiesen war, haben wir uns der Frage zugewandt, ob der Farbstoff in allen Fällen Hypericin ist. Das Absorptionspektrum allein gibt darüber keine Auskunft. Denn auch 4.5.7.4'.5'.7'-Hexahydroxy-*meso*-naphthodianthrone, die an C-2 und C-2' andere Substituenten haben als I, würden, sofern sich diese Substituenten spektroskopisch wie Methylgruppen verhalten, ein Hypericin-Spektrum zeigen. Und das gleiche dürfte für das mit I isomere 2.4.5.4'.5'.7'-Hexahydroxy-2'.7-di-methyl-*meso*-naphthodiantron gelten.



Dagegen müßten Konstitutionsunterschiede der eben genannten Art am Schmp. der benzoylierten Farbstoffe⁶⁾ erkennbar sein. Wir haben daher aus denjenigen *Hypericum*-Arten, die uns in genügender Menge zur Verfügung standen, nach der früher angewandten Methode³⁾ Roh-Hypericin isoliert, es mit Benzoylchlorid-Pyridin umgesetzt und den Schmp. der chromatographisch gereinigten, kristallisierten Benzoate auf dem KOFLER-Block bestimmt. Die dabei gefundenen Unterschiede (Tab. 1) haben gezeigt, daß offenbar keineswegs bei allen Arten der Rohfarbstoff nur Hypericin

⁵⁾ Pharmac. Weekbl. 87, 179 [1952].

⁶⁾ Hypericin schmilzt nicht. Von seinen bisher bekannten Derivaten hat nur das Benzoat einen definierten Schmp.

enthält. Bevor wir auf diesen Befund näher eingehen, soll zunächst ein zweites Kriterium erörtert werden, an Hand dessen wir unsere Farbstoffe auf Identität mit Hypericin geprüft haben; es ist dies ihr Verhalten beim Belichten in konz. Schwefelsäure.

Rohes und kristallisiertes Hypericin aus *H. perforatum* zeigen in konz. Schwefelsäure, in der sie sich grün mit roter Fluoreszenz lösen, zwei Absorptionsmaxima, die beim Belichten der Lösung schnell abgebaut werden, während 15 bzw. 18 mμ kürzerwellig zwei neue Maxima entstehen⁷⁾. Gleichzeitig verstärkt sich die rote Fluoreszenz. Dieser nach längerer Zeit auch im Dunkeln auftretende Effekt blieb dagegen aus bei einem durch Hydrolyse von Fagopyrin⁸⁾ entstehenden roten Farbstoff, der in seinen sonstigen Eigenschaften dem Hypericin gleicht; mit anderen Worten, durch ihr photochemisches Verhalten in konz. Schwefelsäure lassen sich zwei „Hypericine“ voneinander unterscheiden, die in organischen Solvenzien spektroskopisch völlig übereinstimmen. Auf den Rohfarbstoff unserer vierzehn *Hypericum*-Arten angewandt, führte das Verfahren zu einem überraschenden Ergebnis: Dreizehn Präparate zeigten die gleiche Bandenverschiebung wie kristallisiertes Hypericin aus *H. perforatum*, während allein der Farbstoff aus *H. hirsutum* im Spektrum unverändert blieb und sich demnach wie das aus Fagopyrin gewonnene Hypericin verhielt.

Auch noch in anderer Hinsicht nahm der *H. hirsutum*-Farbstoff eine Sonderstellung ein. Er allein lieferte ein Benzoat vom Schmp. 303–304°, während die Benzoate der übrigen Farbstoff-Präparate erheblich niedriger und z. T. recht unscharf schmolzen (Tab. I). Das alles schien zunächst dafür zu sprechen, daß 1) in *H. hirsutum* ein neuer, dem Hypericin sehr ähnlicher Farbstoff vorkommt und 2) diejenigen Farbstoff-Präparate, deren Benzoate höher schmelzen als das Hexabenoat des kristallisierten *H. perforatum*-Hypericins Gemische aus Hypericin und dem neuen, hypericin-ähnlichen Farbstoff sind.

Die experimentelle Überprüfung dieser Annahme ist dadurch erleichtert worden, daß während unserer Arbeit die Synthese^{9,10)} des Hypericins (I) gelang. Wider Erwarten zeigte synthetisches Hypericin beim Belichten in konz. Schwefelsäure nicht die Bandenverschiebung des kristallisierten *H. perforatum*-Hypericins, sondern die Lage der Absorptionsmaxima blieb unverändert wie beim *H. hirsutum*-Farbstoff. Und ebenso wie dieser lieferte das synthetische Hypericin ein kristallisiertes, gelbes Benzoat vom Schmp. 303–304°, das mit dem Benzoat des *H. hirsutum*-Farbstoffes keine Schmp.-Erniedrigung gab.

Um die Identität der beiden Farbstoffe noch weiter zu belegen, haben wir das *H. hirsutum*-Hypericin in kristallisierter Form dargestellt, wobei das früher bei *H. perforatum* angewandte Verfahren³⁾ etwas modifiziert werden mußte. Denn der Rohfarbstoff den man mit Salzsäure aus dem Methanolextrakt der *H. hirsutum*-

⁷⁾ Diese Bandenverschiebung wurde zuerst an rohem Hypericin aus *H. perforatum* von N. PACE und G. MACKINNEY beobachtet; J. Amer. chem. Soc. **63**, 2570 [1941].

⁸⁾ Fagopyrin ist der photodynamische Farbstoff des Buchweizens. H. BROCKMANN, E. WEBER und G. PAMPUS, Liebigs Ann. Chem. **575**, 53 [1952].

⁹⁾ H. BROCKMANN und F. KLUGE, Naturwissenschaften **38**, 141 [1952]; H. BROCKMANN und H. MUXFELDT, ebenda **40**, 411 [1953].

¹⁰⁾ H. BROCKMANN, F. KLUGE und H. MUXFELDT, Chem. Ber. **90**, 2302 [1957].

Blüten gewann, enthielt etwa 60% Beimengungen, die seine Kristallisation aus Pyridin-methanol. Salzsäure verhinderten. Sie blieben zurück, als man den Rohfarbstoff mit siedendem 80-proz. Aceton extrahierte. Aus dem Acetonauszug, der zunächst belichtet wurde, um etwa vorhandenes Proto-hypericin oder Hyperico-dehydro-dianthon²⁾ in Hypericin zu verwandeln, fiel beim Einengen amorphes, 90–95-proz. Hypericin aus, das aus Pyridin-methanol. Salzsäure in dünnen, tief dunkelroten Nadeln (Zers. oberhalb 300°) kristallisierte. Bei 120° getrocknete Präparate enthielten 1 Mol. H₂O, das bei 160° verschwand. Auch aus *m*-Kresol sowie Formamid wurden Kristallivate erhalten. Bruttoformel C₃₀H₁₆O₈ und die in Pyridin, Morpholin sowie konz. Schwefelsäure gemessenen Absorptionskurven¹⁰⁾ waren die gleichen wie beim synthetischen Hypericin. Zinkstaubschmelze¹¹⁾ gab in geringer Ausbeute Anthrodianthren (IV) (identifiziert durch die Absorptionskurve), ein Zeichen, daß die beiden durch KUHN-ROTH-Oxydation nachgewiesenen C-Methylgruppen des Farbstoffes an C-2, C'-2 stehen.

Mit *p*-Brombenzoylchlorid-Pyridin lieferte das *H. hirsutum*-Hypericin ein gelbes, sich beim Erhitzen ohne Schmp. zersetzendes Hexa-*p*-brombenzoat, während das gelbe, kristallisierte Benzoat – der Analyse nach ebenfalls ein Hexabenoat –, wie schon erwähnt, bei 303–304° schmolz und den Schmp. des synthetischen Hypericin-hexabenoates¹⁰⁾ nicht erniedrigte.

Reduzierende Acetylierung nach der früher beschriebenen Methode¹⁾ lieferte das in dunkelblauen Nadeln kristallisierende 4.5.7.4'.5'.7'-Hexaacetoxy-2.2'-dimethyl-*meso*-naphthodianthren (II), das unter gleichen Bedingungen auch aus synthetischem Hypericin entsteht¹⁰⁾. Damit war die Identität des *H. hirsutum*-Hypericins mit synthetischem Hypericin in jeder Hinsicht gesichert, und zu beantworten blieb nur noch, warum kristallisiertes Hypericin aus *H. perforatum*, das in Absorptionsspektrum und Bruttoformel mit synthetischem Hypericin übereinstimmt und nach früheren Versuchen ebenfalls Formel I hat, beim Belichten in konz. Schwefelsäure seine Absorptionsbanden nach kleineren Wellenlängen verschiebt. Die einzige plausible Erklärung für diese Diskrepanz war die, daß die aus *H. perforatum* isolierten Hypericin-Präparate einen zweiten, dem Hypericin sehr ähnlichen Farbstoff enthalten, der für die Bandenverschiebung beim Belichten in konz. Schwefelsäure verantwortlich ist.

Daß dies zutrifft, hat die Untersuchung des in konz. Schwefelsäure belichteten *H. perforatum*-Hypericins gezeigt. Als wir nämlich das Belichtungsprodukt reduzierend acetylierten, anschließend mit Chloranil dehydrierten und dann chromatographisch an aktiviertem Gips adsorbierten, bildete sich neben anderen eine rote und darunter liegend eine blaue Zone aus. Der Inhaltsstoff der blauen Zone hatte in Benzol das gleiche Absorptionsspektrum wie das in gleicher Weise gewonnene, blaue Reduktionsprodukt (II) von synthetischem Hypericin. Der in Lösung grün fluoreszierende Inhaltsstoff der roten Zone dagegen zeigte in Benzol ein Absorptionsspektrum, das dem des Anthrodianthrens (IV) sehr ähnlich war. Die rote Zone enthielt demnach ein Anthrodianthren-Derivat, das bei der reduzierenden Acetylierung aus einem Anthrodianthon-Derivat entstanden sein mußte, und zwar aus einem Anthrodianthon-Derivat, das in kristallisiertem *H. perforatum*-Hypericin noch nicht vorhanden ist. Denn dieses liefert, reduzierend acetyliert, ein kristallisiertes, blaues Acetoxy-2.2'-

¹¹⁾ E. CLAR, Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 1645 [1939].

dimethyl-*meso*-naphthodianthren mit dem gleichen Absorptionsspektrum wie II, nicht aber rote Reduktionsprodukte mit Anthrodianthren-Spektrum.

Damit war bewiesen, daß den kristallisierten, aus *H. perforatum* isolierten Hypericin-Präparaten mindestens noch ein zweiter, von uns *Pseudo-hypericin*¹²⁾ genannter Farbstoff beigemischt ist, der beim Belichten in konz. Schwefelsäure in ein Anthrodiantron-Derivat übergeht.

Über die Konstitution des Pseudo-hypericins ließen sich auf Grund der eben angeführten Beobachtungen folgende Aussagen machen: 1) Pseudo-hypericin enthält, da es bei reduzierender Acetylierung ein blaues Naphthodianthren-Derivat bildet, ebenso wie Hypericin das Ringsystem des *meso*-Naphthodianthrens. 2) Da das blaue Reduktionsprodukt des Pseudo-hypericins in der Lage seiner Absorptionsmaxima mit II übereinstimmt, ist anzunehmen, daß es ebenso wie II an C-2, C-4, C-5, C-7, C-2', C-4', C-5', C-7' sechs Acetoxygruppen und zwei Substituenten trägt, die sich spektroskopisch wie Methylgruppen verhalten. Diese zwei Substituenten müssen an C-2, C-2' (bzw. C-7, C-7') stehen und so gebaut sein, daß sie beim Belichten des Pseudo-hypericins einen neuen, aromatischen Ring schließen, denn nur dann kann das Ringsystem des Naphthodianthrons in das des Anthrodianthrons übergehen. Die Acetoxygruppen des blauen Reduktionsproduktes sitzen demnach an C-4, C-5, C-7, C-4', C-5' und C-7', was bedeutet, daß diese C-Atome im Pseudo-hypericin Hydroxygruppen tragen. 3) Zum gleichen Schluß hinsichtlich der Stellung der Hydroxygruppen führt die Tatsache, daß Pseudo-hypericin das gleiche Absorptionsspektrum hat wie Hypericin. 4) Bei der photochemischen Umwandlung von Pseudo-hypericin findet außer der Neubildung eines aromatischen Ringes keine weitere Reaktion am Ringsystem statt, denn das Umwandlungsprodukt ist spektroskopisch und in seinen Farbreaktionen dem Hypericin sehr ähnlich.

Zu klären blieb die Konstitution der Substituenten an C-2, C-2', die bei Belichtung einen neuen Benzoring schließen. Naheliegend war, an CH_2OH -Gruppen bzw. $\text{CHOH}\cdot\text{CH}_3$ -Gruppen zu denken. Dem Pseudo-hypericin käme dann die Konstitution III bzw. IIIa zu. Wie bereits kurz mitgeteilt¹³⁾, hat die Isolierung und Untersuchung von kristallisiertem Pseudo-hypericin gezeigt, daß ihm die Formel III zuerteilt werden kann. Das Belichtungsprodukt wäre dann nach VI und sein acetyliertes Reduktionsprodukt (analog II) nach V zu formulieren.

Es mag zunächst verwunderlich erscheinen, daß der Pseudo-hypericin-Gehalt des kristallisierten *H. perforatum*-Hypericins solange verborgen geblieben ist. Der Grund liegt in folgendem: Pseudo-hypericin ist viel empfindlicher als Hypericin und wird schon beim Erwärmen in Pyridin sowie beim Aufbewahren in Pyridin-methanol. Salzsäure verändert. Infolgedessen ist der Pseudo-hypericin-Gehalt der zur Analyse mehrfach aus Pyridin-methanol. Salzsäure umkristallisierten Präparate sicher niedriger gewesen als im Rohfarbstoff und dürfte 10% kaum überschritten haben. Ein Pseudo-hypericin-Gehalt dieser Größe kommt aber in den C,H-Werten der Elementaranalyse nicht mehr deutlich zum Ausdruck.

¹²⁾ H. BROCKMANN und W. SANNE, Naturwissenschaften 40, 461 [1953].

¹³⁾ H. BROCKMANN und G. PAMPUS, Naturwissenschaften 41, 86 [1954].

Außerdem ist bei der Bewertung der Analysenzahlen noch folgendes zu berücksichtigen: Kristallisiertes Hypericin hält hartnäckig Pyridin, Methanol und Wasser fest und wurde daher vor der Analyse längere Zeit i. Hochvak. auf 180° erhitzt. Unter diesen Bedingungen bildet Pseudo-hypericin Produkte, deren Analysenzahlen denen des Hypericins ähnlich sind. Selbst eine Beimengung von mehr als 10% Pseudo-hypericin wäre daher im C-Wert der scharf getrockneten Präparate nicht in Erscheinung getreten.

Auch das früher beschriebene, chromatographisch gereinigte, kristallisierte gelbe Hexabenoat³⁾ des *H. perforatum*-Hypericins hat, wie jetzt klar wird, Pseudo-hypericin enthalten, denn sein Schmp. (228° unscharf) lag erheblich niedriger als der von reinem Hypericin-hexabenoat (Schmp. 303–304°). Damit wird auch verständlich, daß die damals gefundenen Benzoylwerte etwa 0.7 % über den berechneten lagen.

Ob dem aus *H. perforatum*-Hypericin gewonnenen blauen Reduktionsprodukt¹⁾ ein entsprechendes Derivat des Pseudo-hypericins beigegeben gewesen ist, bleibt unentschieden. Daß es eine Acetoxygruppe mehr enthielt als II, ist jedenfalls kein Beweis für die Anwesenheit eines Pseudo-hypericin-Derivates, sondern zweifellos milderer Reaktionsbedingungen zuzuschreiben, unter denen nur ein Chinon-Sauerstoffatom entfernt wird. Dementsprechend liegen die Maxima der Heptaacetoxy-Verbindung (624, 578 mμ in Benzol) etwas längerwellig als die von II (621, 575 mμ in Benzol).

Zu erwähnen ist schließlich noch, daß die leuchtend grüne Farbe währ. alkalischer Lösungen von reinem Hypericin beständig ist. Die früher beobachtete Braunfärbung³⁾ erklärt sich durch den Pseudo-hypericin-Gehalt der damaligen Präparate; Pseudo-hypericin färbt sich in alkalischer Lösung schnell braun.

Dank der Beständigkeit des Hypericins gegen Alkali kann Hypericin-hexabenoat ohne Bedenken alkalisch verseift werden. Infolgedessen ist der Rohfarbstoff von *H. hirsutum* bequem über das Benzoat zu reinigen.

Tab. 1. Roh-Hypericin aus verschiedenen *Hypericum*-Arten

Species	Hypericin + Pseudo-hypericin in g/kg getrockneter Blüten	Verschiebung der Absorptions- maxima beim Belichten in konz. H ₂ SO ₄	Schmelztemp. ^{a)} des krist. Benzoylderivates	Im Rohfarbstoff anwesend ^{**)} :	Pseudo- hypericin	Hypericin
1 <i>H. perforatum</i>	1.38	+	234–235°	+	+	
2 <i>H. hirsutum</i>	0.91	–	303–304°	–	+	
3 <i>H. elegans</i> Stephan	1.79	+	233–234°	+	+	
4 <i>H. maculatum</i> Cranz	2.10	+	235–251°	+	+	
5 <i>H. acutum</i> Moench	1.67	+	234–242°	+	+	
6 <i>H. pulchrum</i> L.	0.91	+	262–264°	+	+	
7 <i>H. montanum</i> L.***)	0.78	+		+		–
8 <i>H. humifusum</i> L.	0.83	+		+		?
9 <i>H. coris</i> L.	1.95	+		+	+	
10 <i>H. olympicum</i> L.	0.26	+		+		?
11 <i>H. inodorum</i>	1.30	+		+		–
12 <i>H. lobocarpum</i>	0.52	+		+		–
13 <i>H. barbatum</i> Jacq.	1.42	+		+		–
14 <i>H. densiflorum</i>	0.63	+		+		?
15 <i>H. gentianoides</i> Britton	0.64	+		+		?
16 Synthetisches Hypericin	—	—	303–304°			

Hypericum-Arten ohne rote Farbstoffe: *H. androsaemum* L.; *H. aureum*; *H. calycinum*; *H. Moserianum* André; *H. patulum* Thunb.; *H. patulum* Henryi; *H. Przewalskyanum*; *H. polypodium*.

^{a)} KOFLER-Block, Präparat 50° unterhalb der Schmelz-Temp. aufgelegt. Temperatursteigerung 2°/Min.

^{**)} + anwesend; – abwesend; ? Vorhandensein fraglich, höchstens in Spuren anwesend.

^{***)} Die frühere Angabe (Zitat 2), daß der *H. montanum*-Farbstoff keine Bandenverschiebung gibt, beruht auf einem Irrtum bei der Bestimmung der species.

Tab. 2. Farbstoffgehalt von *Hypericum perforatum* verschiedener Standorte

Standort	Hypericin in mg/g trockener Blüten	Pseudo-hypericin in mg/g trockener Blüten
Göttingen	0.7	0.7
Sooden-Allendorf	0.8	0.9
Lübeck	0.8	1.0
Hameln	1.4	0.5
Bevensen	1.1	0.9

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Bandenverschiebung beim Belichten in konz. Schwefelsäure ein Nachweis für Pseudo-hypericin ist und dieses demnach in dreizehn der von uns untersuchten Arten vorkommt (Tab. 1), erhob sich die Frage, ob alle dreizehn, so wie *H. perforatum* neben Pseudo-hypericin auch Hypericin bilden, oder ob es auch Arten gibt, die nur Pseudo-hypericin produzieren. Diese Frage hätte sich mit dem beim *H. perforatum* angewandten Verfahren — Belichtung des Rohfarbstoffes in konz. Schwefelsäure und chromatographische Trennung des reduzierend acetylierten Belichtungsproduktes — beantworten lassen. Auf die Anwendung dieser etwas umständlichen Methode konnten wir jedoch verzichten, weil sich inzwischen herausgestellt hatte, daß man Pseudo-hypericin und Hypericin im Ring-Papierchromatogramm trennen kann, wenn als stationäre Phase ein 25% Formamid enthaltender Phosphatpuffer vom pH 8.2 und als mobile Phase Butylacetat verwendet wird^{13,14)}. Pseudo-hypericin hat in diesem System einen kleineren R_F -Wert als Hypericin. Bei solchen Arten, von denen uns nur wenig Material zur Verfügung stand, haben wir den roten Methanolauszug frischer Blüten verwendet, der Hypericin und Pseudo-hypericin in nativer Form, d. h. gebunden an farblose Reste unbekannter Konstitution enthält. Denn auch die nativen Farbstoffe lassen sich ring-papierchromatographisch trennen, und zwar bewährte sich hier ein System aus 3 Vol.-Tln. Formamid/7 Vol.-Tln. Wasser/7 Vol.-Tln. Essigester. Das Verfahren ist so empfindlich, daß der Extrakt von 1–2 Blüten zur Analyse ausreicht.

Die Ergebnisse der qualitativen Analyse verschiedener *Hypericum*-Arten sind in Tab. 1 zusammengestellt. In fünf Arten wurde Pseudo-hypericin neben Hypericin, in vier Arten Pseudo-hypericin allein gefunden. Vier weitere enthielten neben Pseudo-hypericin nur sehr wenig Hypericin. Pseudo-hypericin ist demnach weiter verbreitet als Hypericin.

Bei *H. hirsutum* findet sich der Farbstoff nur in kleinen, gestielten, an den Kelchblattändern sitzenden Drüschen. Bei den anderen Arten ist er in Blüten, Blättern und Stengeln in eng umgrenzten, dem bloßen Auge als schwarze Pünktchen oder Striche erkennbaren Bereichen abgelagert.

Zur quantitativen Bestimmung der Farbstoffe wurden die Zonen des Ringchromatogrammes ausgeschnitten, mit Pyridin/n-Butanol (5 + 95) eluiert und die Eluate kolorimetrisch (am besten mit Spektralaufsatzt) mit einer Standardlösung von kristallisiertem Hypericin verglichen. Dieser Vergleich ist möglich, weil Pseudo-hypericin sowie die nativen Farbstoffe in den genannten Lösungsmitteln praktisch das gleiche

¹⁴⁾ G. PAMPUS, Dissertat. Univ. Göttingen 1954.

Absorptionsspektrum haben. Bei Verwendung eines Spektralphotometers mißt man zweckmäßig die Extinktion des längstwelligen Maximums. Mit reinstem, kristallisiertem, bei 180° getrocknetem Hypericin aufgenommene Eichkurven für BECKMAN-Spektralphotometer, LANGE-Kolorimeter und Stufenphotometer sind in Abbild. 1–3 angegeben.

Abbildung. 1
Hypericin-Eichkurve für
BECKMAN-Spektralphotometer.
Lösungsmittel
Pyridin/n-Butanol (5+95);
 $\lambda_{\text{max}}: 594 \text{ m}\mu$; 1-cm-Küvette

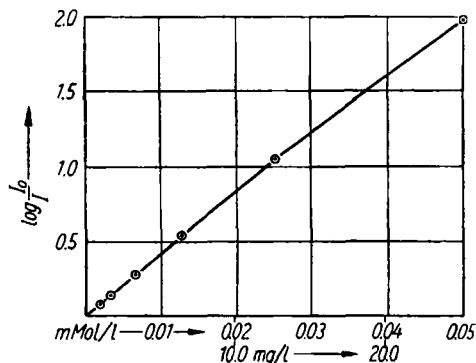


Abbildung. 2
Hypericin-Eichkurve für
LANGE-Kolorimeter.
Lösungsmittel
Pyridin/n-Butanol (5+95);
„Wärmefilter“; 1-cm-Küvette

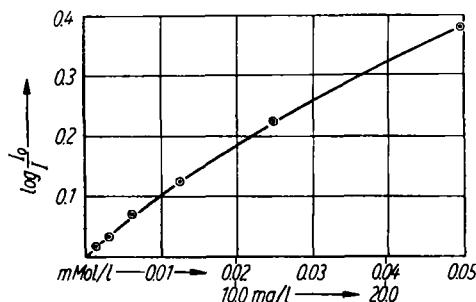
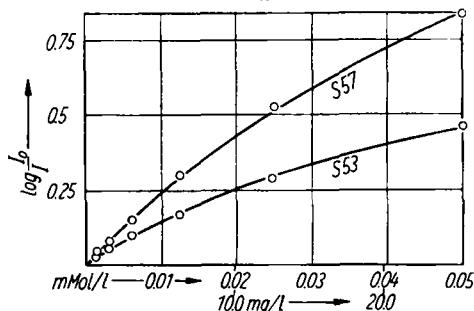


Abbildung. 3
Hypericin-Eichkurve für
ZEISS-PULFRICH-Stufenphotometer.
Lösungsmittel
Pyridin/n-Butanol (5+95);
Filter: S 53 und S 57; 1-cm-Küvette



Auf den Farbstoff von *H. perforatum* verschiedener Standorte angewandt, lieferte die Methode Werte, die in Tab. 2 zusammengestellt sind. In vier Fällen war der Gehalt an Pseudo-hypericin und Hypericin annähernd gleich, und nur in einem wurde fast dreimal soviel Hypericin gefunden als Pseudo-hypericin.

Dem FONDS DER CHEMIE sowie der AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN in Göttingen danken wir für die großzügige Unterstützung unserer Arbeiten, den BOTANISCHEN GÄRten DORTMUND, KREFELD und GÖTTINGEN sowie Herrn Apotheker Dr. HAGENSTRÖM sind wir für die Bereitstellung von Pflanzenmaterial zu Dank verpflichtet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Roh-Hypericin aus verschiedenen Hypericum-Arten: Die an der Luft getrockneten Blüten wurden fein vermahlen und in Mengen, die je nach Zugänglichkeit der einzelnen *Hypericum*-Arten zwischen 0.3 und 1.8 kg lagen, zunächst im Kreisprozeß erschöpfend mit Äther extrahiert. Durch Aufgießen von Methanol auf das Extraktionsgut verdrängte man den Äther und zog nun im Kreisprozeß mit Methanol aus, wobei die ersten 1.5 l des roten Extraktes gesondert aufgefangen wurden. Um Veränderungen durch langes Erhitzen zu vermeiden, wurde der Methanolextrakt im Destillationskolben des Extraktionsapparates wiederholt durch frisches Methanol ersetzt. Zur Entfernung des Äthers engte man den Methanolvorlauf ein, vereinigte ihn mit der Hauptmenge des Methanolextraktes und dampfte diesen soweit ein, bis, bezogen auf 1 kg extrahierter Blüten, noch 1 l Methanol vorhanden war.

Zur Ausfällung des Hypericins brachte man den konzentrierten Methanolextrakt durch Zugabe von 25-proz. methanol. Salzsäure auf einen HCl-Gehalt von 2.5 %, teilte ihn in drei gleiche Portionen und bewahrte diese, um die optimalen Abscheidungsbedingungen zu ermitteln, bei 0°, 20° bzw. 28° auf. Nach zwei Tagen zentrifugierte man das Ausgefallene ab, hielt jede Lösung noch einen weiteren Tag bei der gleichen Temperatur und zentrifugierte einen etwa ausgefallenen Niederschlag ab. Nach Trocknen (i. Vak. über konz. H_2SO_4 und Kaliumhydroxyd) wurde der Hypericingehalt der Fällungen durch kolorimetrischen Vergleich mit einer Hypericin-Standardlösung ermittelt. Optimal sind die Fällungsbedingungen, wenn der gesamte Farbstoff mit einem Minimum von Begleitfarbstoffen abgeschieden wird.

Zur Reinigung wurden die Fällungen mit Petroläther (Sdp. 70–80°) und anschließend mit Methanol ausgekocht. Der dabei erhaltene Rückstand ist im folgenden als *Roh-Hypericin* bezeichnet.

Kolorimetrische Hypericin-Bestimmung. a) *Im Roh-Hypericin:* Eine (auf 0.002 mg genau abgewogene) Menge zwischen 0.6 und 0.8 mg Roh-Hypericin kochte man mit 6–8 ccm Pyridin aus, filtrierte, wusch das Filter mit wenig heißem Pyridin nach und füllte das Filtrat nach Abkühlen auf 10 ccm auf. Diese Lösung wurde in einem mit Spektralaufsatzen versehenen Kolorimeter mit einer Standardlösung verglichen, die in 1 ccm Pyridin 0.05 mg reines Hypericin (aus *H. hirsutum*) enthielt.

b) *In der Blüte:* Den Methanolextrakt einer (auf 0.002 mg abgewogenen) kleinen Blütenmenge versetzte man mit einigen Tropfen 25-proz. methanol. Salzsäure, kochte 2 Min., ließ das Lösungsmittel im Exsikkator über konz. Schwefelsäure und festem Kaliumhydroxyd verdunsten und nahm den Rückstand in Pyridin auf. Nach Filtrieren wurde auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und ein aliquoter Teil, wie oben beschrieben, kolorimetriert.

Kristallisation von Hypericin: 500 mg Roh-Hypericin löste man unter Schütteln in 800 ccm 80-proz. wäßrigem Aceton, filtrierte die Lösung durch ein Filter aus gepulvertem Kieselgel, wusch mit 80-proz. Aceton nach und engte das Filtrat auf dem Wasserbad ein, bis das Aceton entfernt war. Das ausgefallene Hypericin wurde abzentrifugiert und i. Vak. getrocknet. 400 mg dieses Produktes löste man in 8 ccm siedendem Pyridin und versetzte unter Eiskühlung im Laufe 1 Stde. tropfenweise, anfangs langsamer, später schneller, mit insgesamt 10 ccm einer 20-proz. methanol. Salzsäure. Das auskristallisierte Hypericin (70–85 % des Ausgangsmaterials) wurde mit Wasser und Methanol gewaschen.

Benzoylierung der Hypericin-Präparate: Eine Lösung von 100 mg Roh-Hypericin in 5 ccm Pyridin wurde tropfenweise mit 1.2 ccm frisch dest. Benzoylchlorid versetzt und nach 15 Std. in 80 ccm Methanol gegossen. Das abzentrifugierte, zweimal mit Methanol gewaschene und getrocknete Benzoat löste man in 150 ccm Benzol, vermischt mit 150 ccm Benzin und gab

die Lösung durch eine Säule von aktiviertem¹⁵⁾ Gips. Das beim Nachwaschen mit Benzol-Benzin (1:1) erhaltene gelbe Filtrat verdampfte man, nahm den Rückstand in 4 ccm Benzol auf und stellte diese Lösung in einen mit Benzin beschickten Exsikkator. Nach drei Tagen wurden die ausgefallenen Kristalle des Benzoates abgesaugt und nochmals in gleicher Weise umkristallisiert. Etwaige Verunreinigung des Benzoates durch Benzoësäure-anhydrid ließ sich unter dem Mikroskop leicht erkennen und durch weiteres Umkristallisieren entfernen.

Hypericin aus Hypericum hirsutum: 7 kg trockenes Blütenmehl aus 103 kg Blütenknospen von *Hypericum hirsutum* wurde in Portionen von 900 bis 1200 g, wie oben beschrieben, mit Äther und dann mit Methanol im Kreisprozeß extrahiert. Die gesammelten Methanol-auszüge engte man auf insgesamt 11.5 l ein und leitete in die zentrifugierte, auf 8° abgekühlte Lösung in raschem Strom 280 g Chlorwasserstoff, wobei die Temperatur auf 30° stieg. Der nach dreitägigem Aufbewahren bei 28° ausgefallene Rohfarbstoff (getrocknet 21.5 g) wurde mit Petroläther (Sdp. 60—70°), Methanol und Dioxan (bei 200—300 Torr) heiß extrahiert. Die Dioxanextraktion brach man ab, als der Extrakt nicht mehr violett, sondern rot abließ.

Der Rückstand (11.6 g mit 37.4 % Hypericin) wurde in Anteilen von 1 g zweimal mit 800 ccm Aceton (20 % Wasser enthaltend) 1 Stde. unter Rückfluß ausgekocht, wobei alles Hypericin in Lösung ging. Je 800 ccm des Auszuges filtrierte man durch eine Säule von Kieselgel (20 × 5 cm), belichtete (um Proto-hypericin in Hypericin umzuwandeln) das Filtrat unter Durchleiten eines langsamen Luftstromes 2 Stdn. lang in 10 cm Abstand mit einer 1000-Watt-Lampe und verdampfte das Aceton bei 300—400 Torr auf dem Wasserbad. Der aus der wäßrigen Suspension abzentrifugierte Farbstoff (Gesamtmenge 2.6 g aus 7 kg getrockneter Blüten) enthielt 90—95 % Hypericin. Er wurde, wie oben beschrieben, aus Pyridin-methanol. Salzsäure umkristallisiert, wobei man auf 150 mg Farbstoff 6 ccm Pyridin verwendete. Das Hypericin schied sich in feinen, schwarzen Nadelchen ab.

4.114 mg Subst.: 10.72 mg CO₂, 1.11 mg H₂O.

C₃₀H₁₆O₈ (504.4) Ber. C 71.42 H 3.19 2C-CH₃ 6.0 Gef. *) C 71.11 H 3.02 C-CH₃ 4.5

*) Getrocknet i. Hochvak. bei 180°.

Hypericin-hexabenoat: Benzoylierung des Hypericins und Reinigung des Rohbenzoates erfolgte wie oben beschrieben. Das Benzoat kristallisierte aus Benzol-Petroläther in hellgelben Nadeln und Täfelchen vom Schmp. 303—304° (KOFLER-Block, korrig.).

5.374 mg Subst.: 15.07 mg CO₂, 1.73 mg H₂O. — 15.15 mg Subst.: 5.56 ccm 0.01433 n NaOH.

C₇₂H₄₀O₁₄ (1129.1) Ber. C 76.59 H 3.57 6C₆H₅CO 55.8

Gef. *) C 76.52 H 3.60 C₆H₅CO 55.3

*) 4 Stdn. i. Hochvak. bei 120° getrocknet.

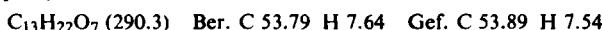
Hypericin aus Hypericin-hexabenoat: In eine Lösung von 15 g Kaliumhydroxyd in 150 ccm Methanol, die im Stickstoffstrom 5 Min. unter Rückfluß gekocht hatte, trug man 570 mg Hypericin-hexabenoat ein, kochte 1 Stde. im Stickstoffstrom unter Rückfluß und filtrierte durch eine Glasfritte in 200 ccm 4 n HCl. Das abzentrifugierte, mit Wasser und Methanol gewaschene Hypericin wurde, wie oben beschrieben, umkristallisiert.

Hypericin-hexa-p-brombenzoat: 200 mg *Roh-Hypericin* aus *Hypericum hirsutum* schüttelte man 2 Stdn. mit 10 ccm Pyridin und 2 g *p*-Brom-benzoylchlorid, goß in 200 ccm Methanol, zentrifugierte die hellgelbe Fällung ab und wusch mit wenig Methanol nach. Zur Reinigung wurde aus Petroläther-Benzol (1:3) an aktiviertem¹⁵⁾ Gips adsorbiert und der Rückstand

¹⁵⁾ Anhydrit der Harzer Gipswerke ROBERT SCHIMPF, fein gemahlen, durch Aufschlämmen in Methanol von feinsten Teilchen befreit, 4 Stdn. auf 120° und 1/2 Stde. auf 160° erhitzt,

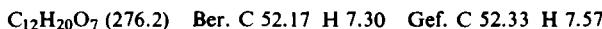
Trockne verdampft und der meist rasch kristallisierende Rückstand aus 50ccm heißem 99-proz. Alkohol umkristallisiert. Ausb. an seidig glänzenden Nadelchen 9.1g (73 % d.Th.). Die Substanz schmilzt bei 137.5–139°. $[\alpha]_D^{20} : -0.71^\circ \times 5/0.1020 \times 1 = -34.8^\circ$.

Cyclohexyl-β-D-glucuronsäure-methylester (VIII): Eine Suspension von 8.32g (0.02 Mol) des *Triacetyesters VII*, in 100ccm absol. Methanol, wird nach Zusatz von 0.5ccm 1.16*n* Natriummethylat gerührt, bis eine klare (gelbliche) Lösung entstanden ist. Nach etwa 15 stdg. Aufbewahren im Kühlschrank und nach Klären mit Kohle wird das glasklare Filtrat i. Vak. zur Trockne verdampft. Der sirupöse Rückstand wird mit 25ccm heißem Essigsäure-butylester aufgenommen und nach Zusatz von etwa der gleichen Menge Petroläther abgekühlt. Die Substanz *VIII* kristallisiert in feinen Nadelchen aus. Aus der Mutterlauge läßt sich durch Petroläther noch eine weitere Portion gewinnen. Durch Lösen in etwa 10ccm heißem Butylacetat, Zusatz von Petroläther bis zur eben beginnenden Trübung und Abkühlen wird die Substanz rein erhalten. Aus der Mutterlauge wird ein weiterer Anteil gewonnen. Um das sehr hartnäckig anhaftende Lösungsmittel vollständig zu entfernen, muß bei 80° i. Vak. über Kieselgel getrocknet werden. Ausb. 4.9g (84 % d.Th.). Schmp. 134–135°. Es wurde auch eine bei 116–118° schmelzende (vielleicht nicht ganz reine) Modifikation erhalten, die sich beim langsamem Erhitzen in die höher schmelzende umwandelt. $[\alpha]_D^{20} : -1.19^\circ \times 2/0.0398 \times 1 = -59.7^\circ$ (in CH₃OH).



Der Ester ist leicht löslich in Wasser, Methanol, Äthanol und Aceton, schwerer in Essigester und Butylacetat, so gut wie unlöslich in Äther, Petroläther, CHCl₃ und Benzol.

Cyclohexyl-β-D-glucuronid (IX): Eine Lösung von 4.35g (0.015 Mol) des *Methylesters VIII* in 38ccm 0.43*n* Ba(OH)₂ wird nach etwa 1stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur mit der ber. Menge Oxalsäure (8.42ccm einer 2*n* Lösung) langsam unter Rühren versetzt. Nach etwa 1stdg. Aufbewahren im Kühlschrank wird vom Bariumoxalat abgesaugt und i. Vak. (Badtemp. 40°) zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in absol. Alkohol aufgenommen, nach etwa 15stdg. Aufbewahren im Kühlschrank weiteres Bariumoxalat abgesaugt, das Filtrat über Kohle und Kieselgur filtriert und i. Vak. bis zur reichlichen Kristallisation eingeengt. Durch Erwärmen bis zur Auflösung und Abkühlen, zuletzt mehrere Stdn. im Kühlschrank, erhält man das freie Glucuronid. Durch ein- bis zweimaliges Umkristallisieren aus 99-proz. Alkohol und Trocknen bei 80° i. Vak. über P₂O₅ gewinnt man 3.7g (88 % d.Th.) an reiner Substanz vom Schmp. 169–171° (unter Gasentwicklung und, falls die Substanz nicht ganz trocken war, geringem Sintern bei etwa 130°). $[\alpha]_D^{21} : -1.93^\circ \times 2/0.0626 \times 1 = -61.6^\circ$ (in Wasser).



Die getrocknete Substanz ist hygroskopisch. Auch Alkohol wird (beim Umkristallisieren) hartnäckig festgehalten. In Wasser und Methanol ist die Substanz leicht löslich, schwerer in Alkohol und Aceton, so gut wie unlöslich in den sonstigen gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln.

Nach der gleichen Methode wie die Cyclohexylderivate (*VII*, *VIII* und *IX*) wurden auch die Benzyllderivate hergestellt:

Triacetyl-benzyl-β-D-glucuronsäure-methylester (X): Ausb. an zweimal aus Methanol umkristallisierter Substanz 46.5 % d.Th., Schmp. 135–136°. $[\alpha]_D^{20} : -66.2^\circ$ (in CHCl₃).



Benzyl-β-D-glucuronsäure-methylester (XI): Ausb. an zweimal aus Butylacetat kristallisierter Substanz 68 % d.Th., Schmp. 131–132°. Das hartnäckig haftende Lösungsmittel wird

weiterer Belichtung nicht mehr. Die Schwefelsäurelösung goß man auf Eis, wusch den Niederschlag mit Wasser und Methanol, löste ihn nach Trocknen in 10 ccm Acetanhydrid, versetzte mit wenig wasserfreiem Natriumacetat sowie Zinkstaub und kochte, bis die Lösung gelb geworden. Nach Zersetzung des überschüssigen Acetanhydrides mit heißem Wasser nahm man das ausgefallene Reduktionsprodukt in 5 ccm Benzol auf, schüttelte mit Wasser durch und kochte die mit Natriumsulfat getrocknete Benzollösung 3 Min. mit 20 mg Chloranil. Nach eintätigigem Aufbewahren unter Luftabschluß wurde die Benzollösung an aktiviertem Gips chromatographiert. Beim Nachwaschen mit Benzol bildeten sich (von oben nach unten beziffert) folgende Zonen aus: 1) rot, 2) schmal, rot, 3) gelb-grün, 4) blau, 5) grün, 6) gelb.

Zone 6 enthielt überschüssiges Chloranil und konnte mit Benzol leicht eluiert werden. Zone 5 ließ sich mit Benzol-Methanol 100:1, Zone 4 mit Benzol-Methanol 10:1 eluieren. Der Inhaltsstoff der roten Zone 1 wurde mit Pyridin eluiert. Nach Verdampfen der Eluate von Zone 1 und Zone 4 maß man die Absorptionsmaxima des Rückstandes in Benzol. Rote Zone 1: (Benzollösung fluoresziert grünlich) 532, 496 m μ ; blaue Zone 4: 621, 575 (532) m μ .

Kolorimetrische Bestimmung von Hypericin und Pseudo-hypericin in Hypericum-Blüten: 1 oder 2 frische Blüten wurden gewogen und mit 3–5 ccm Methanol 4–6 Std. bei Zimmertemperatur digeriert. Getrocknete Blüten, deren Farbstoff sich, auch wenn sie fein gepulvert sind, schwerer extrahieren läßt, wurden mit Methanol erwärmt. Den roten Methanolauszug belichtete man im Abstand von 20 cm 1 Stde. mit einer 100-Watt-Lampe, engte dann auf 0.5 ccm ein und brachte die rotbraune Lösung auf den Startkreis des Filtrerpapiers (SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b). Das Papier legte man nach G. ZIMMERMANN und K. NEHRING¹⁷⁾ zwischen Deckel und Unterteil eines Exsikkators, der mit der unteren Phase eines Gemisches aus 3 Vol.-Tln. Formamid, 7 Vol.-Tln. Wasser und 7 Vol.-Tln. Essigester beschickt war. Die obere Phase des Gemisches brachte man in einen Tropftrichter mit ausgezogenem Rohr, der mit einem Stopfen in den Deckelstab des Exsikkators eingesetzt war. Nachdem sich im Verlauf von 30 Min. Atmosphäre und Papier im Exsikkator mit Lösungsmitteldämpfen gesättigt hatten, begann man mit der Entwicklung des Ringchromatogramms, indem man die obere Phase des Gemisches aus dem Tropftrichter auf eine Filtertablette (SCHLEICHER & SCHÜLL 292) tropfen ließ, die in der Mitte des Startkreises auf dem Filtrerpapier-Bogen lag.

Nach Trennung der Zonen ließ man den Bogen an der Luft trocknen, schnitt die Zonen sofort heraus und eluierte sie unverzüglich in einem Meßkolben mit Pyridin/n-Butanol (5 + 95). Nachdem bis zur Marke aufgefüllt war, wurde die Lösung kolorimetrisch mit einer Standardlösung von reinstem Hypericin verglichen.

¹⁷⁾ Angew. Chem. 63, 556 [1951].