

Note

Die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung des Phytoalexins 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin nach Abtrennung durch Gelfiltration

HARALD MÜLLER

Bundeforschungsanstalt für Ernährung, Engesserstrasse 20, D-7500 Karlsruhe 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 16. September 1977)

Die Bildung von 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin (MMHD) in der Möhrenspeicherwurzel¹ wird durch Pilzbefall², Verletzung, niedrige Lagertemperatur³ und Einwirkung von Äthylen⁴ u.a. Wuchsstoffen⁵ ausgelöst.

MMHD wird für den Bittergeschmack bei gelagerten Möhren verantwortlich gemacht, obwohl es scheint, dass noch andere Verbindungen beteiligt sind. Gegenüber dem Säugetierorganismus weist es nur schwach toxische Eigenschaften auf⁶. Seine Einstufung als Phytoalexin beruht auf seiner stark fungistatischen Wirkung^{2,7}.

Lagerungsversuche mit Möhren gebräuchlicher deutscher Sorten sollten über die MMHD-Bildung bei Kaltlagerung, Verletzung und nach Pilzbefall Auskunft geben (darüber wird demnächst an anderer Stelle publiziert). Die dafür ausgearbeitete fluoreszenzspektroskopische Bestimmungsmethode nach Abtrennung des MMHD vom störenden β -Carotin durch Gelfiltration soll hier vorgestellt und die Ergebnisse mit den nach den üblichen UV-spektroskopischen Methoden^{3,6-8} gewonnenen verglichen werden.

MATERIAL UND METHODEN

Extraktion

Eine wägbare Menge an MMHD für die Eichlösungen wurde aus Möhren gewonnen, die im Boden überwintert hatten. Wie auch bei den quantitativen MMHD-Bestimmungen (mit 50 g Frischsubstanz) wurde die Frischsubstanz in Gegenwart von 200 ml *n*-Hexan mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und mehrere Stunden geschüttelt. Nach dem Absaugen über eine Filternutsche wurde die Prozedur noch einmal wiederholt. Von aliquoten Teilen (meistens 1/10) wurde im Vakuum-Rotationsverdampfer das *n*-Hexan abdestilliert und die Rückstände zweimal mit 2 ml Äthanol behandelt. Nach dem Abzentrifugieren des unlöslichen Anteils gelangten 2 ml Überstand zur chromatographischen Reinigung.

Gelfiltration

Die Trennung erfolgte an Sephadex LH 20 mit Äthanol als Elutionsmittel. Der Beladbarkeit der Säule waren durch die Anwesenheit des grossen β -Carotin-Überschusses Grenzen gesetzt (Δ 5 g Möhrenfrischsubstanz).

Kieselgel-Säulenchromatographie

Zur Gewinnung einer befriedigend reinen MMHD-Menge für die Eichlösungen und zur Überprüfung der Ergebnisse von den verschiedenen Bestimmungsmethoden wurde der Sephadex LH 20 eine Kieselgel-Säulenchromatographie⁹ [mit Kieselgel Merck (< 0.08 mm) und 1.5% Aceton in Chloroform] nachgeschaltet. Dabei konnten alle Begleitkomponenten, ausser einem Restgehalt an Eugenin (5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromon), abgetrennt werden.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel G-Schichten mit dem Fliessmittel Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (5:4:1)⁷. Hierdurch war der Nachweis des Eugenin möglich, das oft das MMHD begleitet. Da das Eugenin im Gegensatz zum MMHD nicht zur Fluoreszenz angeregt werden kann, wurde es durch Anfärbung mit diazotierter Sulfanilsäure nachgewiesen.

Fluoreszenzmessung

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten in äthanolischer Lösung mit dem Perkin-Elmer Fluorescence Spectrophotometer 204 bei 455 nm. Als Anregungswellenlänge waren sowohl 273 als auch 305 nm brauchbar.

UV-Absorptionsmessung

Sie wurden mit dem Spektralphotometer PMQ II (Carl Zeiss, Oberkochen, B.R.D.) durchgeführt. Bei der Auswahl von Lösungsmittel und Wellenlänge richteten wir uns nach den zum Vergleich dienenden Nachweismethoden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Eichlösung wies das für das MMHD charakteristische UV-Absorptionsspektrum auf (λ_{\max} . 216, 267, 300 nm), obwohl das Dünnschichtchromatogramm noch Eugenin-Beimengungen anzeigte. Durch präparative dünnschichtchromatographische Trennung, Isolierung und Messung der Extinktionen konnten über die molaren Extinktionskoeffizienten⁶ die Anteile an beiden Verbindungen in der Eichlösung ermittelt werden.

Die Verunreinigung an Eugenin (λ_{\max} . 211, 229, 249, 256, 290 nm) betrug 10.3%. Die Fluoreszenzmessung wird durch das Eugenin nicht gestört, bei den üblichen UV-Absorptionsmessungen bei 265–267 nm trägt aber der Eugenin-Anteil zur gemessenen Extinktion bei, obwohl sein Spektrum in diesem Bereich ein Minimum aufweist. Da bei den bisher angewandten Bestimmungsmethoden für das MMHD seine Anreicherung lediglich durch die teilweise Abtrennung der Störsubstanzen erfolgte, haben noch andere Komponenten zur Vortäuschung von MMHD beigetragen.

Fig. 1 zeigt die Abtrennung des β -Carotins durch Gelfiltration, das ein starker Quencher ist und deshalb vor der Fluoreszenzmessung quantitativ abgetrennt werden muss. In Fig. 2 ist das Anregungsspektrum von MMHD mit seinen Maxima bei 273 und 305 nm wiedergegeben, das Emissionsmaximum liegt bei 455 nm.

Die Ergebnisse von den verschiedenen Bestimmungsmethoden nach jeweils

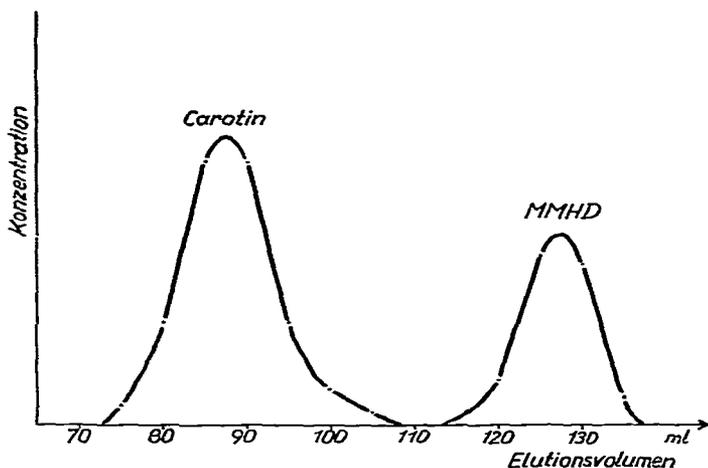


Fig. 1. Trennung von MMHD und β -Carotin durch Gelfiltration an Sephadex LH 20. Säule, 30 cm \times 2.1 cm I.D.; Eluant, Äthanol; Durchfluss, 40 ml/h.

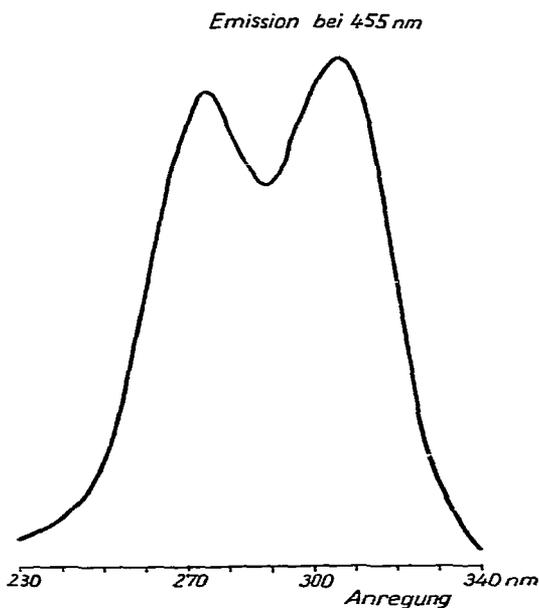


Fig. 2. Fluoreszenz-Anregungsspektrum von MMHD in äthanolischer Lösung.

gleichem Reinigungsschritt sind in Tabelle I gegenübergestellt. Drei Möhrenproben (Nr. 1–3) mit stark unterschiedlichen Gehalten waren dabei zur Analyse gelangt.

Nachweismethode A (Tabelle I) liefert bei Messung des Rohextraktes völlig falsche Ergebnisse. Die empirisch ermittelte Berechnungsformel nach Extinktionsmessung bei drei verschiedenen Wellenlängen liefert nur bei sehr hohen MMHD-Gehalten und Carotinabtrennung befriedigende Ergebnisse. Selbst nach der Kieselgel-Säulenchromatographie sind die Ergebnisse von Proben mit niedrigen Gehalten un-

TABELLE I

VERGLEICH DER ERGEBNISSE, DIE NACH DREI VERSCHIEDENEN METHODEN ZUR MMHD-BESTIMMUNG GEWONNEN WURDEN: (A)^{3,5} UV-ABSORPTIONSMESSUNG BEI 240, 265 und 290 nm, (B)^{6,7} UV-ABSORPTIONSMESSUNG BEI 267 nm UND (C) FLUORESCENZMESSUNG BEI 455 nm NACH ANREGUNG BEI 273 ODER 305 nm

Methode	Proben-Nr.	MMHD-Gehalt (mg) pro 100 g Frischsubstanz		
		Messung des <i>n</i> -Hexan-Extrakts	Messung nach Sephadex LH 20-Chromatographie	Messung nach Sephadex LH 20- und Kieselgel-Chromatographie
A	1	12.23	0.07	0.04
	2	10.52	2.85	1.18
	3	21.51	9.77	9.42
B	1		0.54	0.24
	2		3.96	1.58
	3		10.70	9.50
C	1		0.14	0.15
	2		1.41	1.33
	3		9.39	9.08

befriedigend. Nachweismethode B liefert in jedem Falle zu hohe Werte, die Abweichungen sind aber bei hohen Gehalten noch akzeptabel. Die fluoreszenzspektroskopische Methode (Nachweismethode C) ist dagegen über einen weiten Konzentrationsbereich anwendbar, wenn zuvor das β -Carotin durch Sephadex LH 20-Chromatographie quantitativ abgetrennt wird. Auf die zeitaufwendige Kieselgel-Säulenchromatographie kann in diesem Falle verzichtet werden.

LITERATUR

- 1 E. Sondheimer, *J. Amer. Chem. Soc.*, 79 (1957) 5036.
- 2 P. Condon und J. Kuć, *Phytopathology*, 50 (1960) 267.
- 3 E. Sondheimer, W. F. Phillips und J. D. Atkin, *Food Res.*, 20 (1955) 659.
- 4 B. C. Carlton, C. E. Peterson und N. E. Tolbert, *Plant Physiol.*, 36 (1961) 550.
- 5 E. Chalutz, J. E. DeVay und E. C. Maxie, *Plant Physiol.*, 44 (1969) 235.
- 6 D. T. Coxon, R. F. Curtis, K. R. Price und G. Levett, *Phytochemistry*, 12 (1973) 1881.
- 7 B. A. Herndon, J. Kuć und E. B. Williams, *Phytopathology*, 56 (1966) 187.
- 8 E. Sondheimer, *Food Res.*, 22 (1957) 296.
- 9 H. W. Schroeder und R. D. Stipanovic, *Appl. Microbiol.*, 29 (1975) 706.