

POSTMORTALE BILDUNG VON 5,7-DIHYDROXYCHROMON-7-RUTINOSID IN *MENTHA LONGIFOLIA*

MARTHA STOCKER und RICHARD POHL✱

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg i. Brg., Deutschland

(Revised received 30 October 1975)

Key Word Index—*Mentha longifolia*; Lamiaceae; eriodictyol 7-rutinoside; 5,7-dihydroxychromone 7-rutinoside; postmortem genesis.

Abstract—5,7-Dihydroxychromone 7-rutinoside isolated from *Mentha longifolia* must be considered to be a product of postmortem processes. It is only formed after heating fresh plant material and its production is connected with the degradation of flavonoids, and particularly of eriodictyol 7-rutinoside. Investigations with four other *Mentha* species confirm these results. Eriodictyol 7-rutinoside and eriodictyol are degraded up to 50% by horseradish peroxidase but 5,7-dihydroxychromone-7-rutinoside cannot be detected.

Bei der Analyse der Flavonoide von *Mentha longifolia* Huds. isolierten wir ein Glykosid, das als 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosid identifiziert wurde [1–3]. Da die für natürliche Chromone übliche Substitution in Position 2 und/oder 3 fehlt, richtete sich unser Interesse neben der Synthese [4] vor allen Dingen auf die Aufklärung der Genese dieses seltenen Chromons.

Fukushima *et al.* [5] berichteten zuerst über ein im Heterocyclus unsubstituiertes, natürliches Chromon (5,7-Dihydroxy-6,8-dimethylchromon-7-glucosid) aus *Leptorumohra miqueliana*. Das Aglykon des von uns aus *Mentha longifolia*-Blättern gewonnenen 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosids wurde von Pendse *et al.* [6] in *Arachis hypogaea*-Schalen und von Romussi *et al.* [7] in *Polygonum persicaria*-Samen aufgefunden. Die genannten Species führen daneben noch eine Reihe von Flavonoiden, insbesondere Flavone und Flavonole. Hinweise zur Aufklärung der Biogenese dieser Chromone sind außer von Birch *et al.* [8] in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Birch *et al.* [8] vermuteten, daß diese seltenen Chromonderivate aus Flavanonen durch Oxidation entstehen, da ihnen *in vitro* die Spaltung von 4-Hydroxyflavanon in Chromon und Hydrochinon gelang.

Die von uns untersuchte *M. longifolia* enthält u.a. das Flavanon Eriodictyol-7-rutinosid [1]. Untersuchungen an den Blättern hinsichtlich des Auftretens von Eriodictyol-7-rutinosid und 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosid brachten folgende Ergebnisse: in einem Zeitraum von 2 Jahren wurden an verschiedenen Standorten und zu verschiedenen Jahreszeiten in flüssigem Stickstoff gesammelte Blätter nach einem vereinfachten Extraktionschema aufgearbeitet. 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosid war in keiner dieser Proben nachweisbar. Wurde das Pflanzenmaterial vor dem Aufarbeitungsprozess einer mehrstündigen Trocknung bei 80° unterzogen, wie bei [9], konnte dünnschichtelektrophoretisch [3] 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosid nachgewiesen werden (ca 1 mg/100 g Trockengewicht). Der Gehalt an Eriodictyol-7-rutinosid erfuhr eine deutliche Minderung (von ca 6 mg/100 g Trockengewicht auf unter 0,5 mg/100 g Trockengewicht). Untersuchungen an weiteren *Mentha* species

(*M. spicata*, *M. aquatica*, *M. rotundifolia*, *M. piperita*) brachten ähnliche Ergebnisse. Dabei bestehen bei diesen Arten keine qualitativen Unterschiede in ihrem Flavonoidspektrum, wohl aber quantitative [10]. Gefriergetrocknetes Material von *M. spicata* und *M. rotundifolia* enthält Eriodictyol-7-rutinosid unter 0,1 mg/100 g Trockengewicht. Nach dem oben angegebenen Aufarbeitungsschema konnte in beiden Arten dünnschichtelektrophoretisch kein 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosid nachgewiesen werden.

Inkubiert man Eriodictyol-7-rutinosid bzw. sein Aglykon mit einem aus *M. longifolia* gewonnenen Enzymrohsaft (5 µMol/0,3 ml; s. Experimentelles), so läßt sich das entsprechende Chromonderivat dünnschichtelektrophoretisch [3] erstmals nach einer Inkubationszeit von ca 14 Stunden nachweisen. Bei Versuchen mit geringerer Substratkonzentration, jedoch mit bis zum Sephadexfiltrat (s. Experimentelles) aufgereinigten Enzympräparationen (5 µMol/3 ml) konnte frühestens nach 24 Stunden bei 256 nm (= λ_{max} von 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosid) eine schwache Bande im UV-Gesamtspektrum aufgezeigt werden. Die langen Reaktionszeiten legen den Verdacht nahe, daß die Bildung des Chromons über eine oder mehrere Zwischenstufen verläuft und nicht nur enzymatischer Natur zu sein braucht.

Eine große Anzahl phenolischer Substrate geht mit Peroxidase anabole, metabole oder Polymerisationsreaktionen ein [11]. Wir haben deshalb die Umwandlung von Eriodictyol und Eriodictyol-7-rutinosid mit Meerrettichperoxidase überprüft. Diese Untersuchungen bestätigen die Beobachtungen von Schreiber [12,13], daß für die Reaktion mit Peroxidase gewisse strukturelle Voraussetzungen notwendig sind (3-OH; Δ 2,3-Doppelbindung; 4'-OH). Sowohl Eriodictyol als auch Eriodictyol-7-rutinosid wurden durch Meerrettichperoxidase bis zu maximal 50% abgebaut; eine neue Bande im UV-Spektrum konnte dagegen nicht festgestellt werden. Der Abbau des Glykosids verlief langsamer als der des Aglykons. Das erwartete Abbauprodukt 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosid bzw. 5,7-Dihydroxychromon war nicht nachweisbar.

Aus diesen Untersuchungen muß der Schluß gezogen werden, daß das aus *Mentha longifolia*-Blättern isolierte 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosid ein Artefakt ist. Aus-

✱ Verstorben, August 1975.

gelöst durch die Hitzebehandlung des Pflanzenmaterials werden postmortale Prozesse eingeleitet, die zur Bildung dieses seltenen Chromonderivates führen. Dabei muß die Genese von 5,7-Dihydroxychromon-7-rutinosid in engen Zusammenhang mit einem Flavonoidabbau gebracht werden, wobei nach dem augenblicklichen Stand [3,7] wahrscheinlich Flavanone und Flavonole die Precursor-Funktion zukommt. Die Frage nach dem Chemismus der Abbaureaktionen und ob ausschließlich enzymatische Reaktionsabläufe oder auch nichtenzymatische Folgereaktionen stattfinden sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

EXPERIMENTELLES

Chemikalien und Geräte. Die Isolierungsmethoden von Eriodictyol und Eriodictyol-7-rutinosid wurden bereits beschrieben [9]. Meerrettichperoxidase (E.C.1.11.1.7) Reinheitsgrad II stammte von der Fa. Boehringer Mannheim. Die Enzymumsetzungen wurden in einem Beckman DB Spektralphotometer oder im Zeiss Spektralphotometer PMQ II unter Thermostatisierung bei 30° durchgeführt. Die Durchführung der Dünnschichtelektrophorese erfolgte in einem ElphorGerät der Fa. Bender u. Hohbein München mit Polyamid als Sorbens und 6 mM Phosphatpuffer pH 7,8 als Elektrolytlösung (Spannung 120 V).

Pflanzenmaterial. Das Pflanzenmaterial von *M. longifolia* Huds. stammte von einem wildwachsenden Standort bei Aisberg (Kreis Waldshut) im Südschwarzwald; die übrigen *Mentha* species sind aus Kulturen des institutseigenen Versuchsfeldes.

Extraktion des Pflanzenmaterials. 10 g Droge (gefriergetrocknet oder hitzegetrocknet) wurde mit 200 ml MeOH versetzt und 24 Std. am Soxhlet extrahiert. Der methanolische Extrakt wurde 24 Std. bei -20° in der Tiefkühltruhe beiseite gestellt und anschließend 30 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde am Vakuumrotationsverdampfer zur Sirupdicke eingengt, 8 Std. mit heißem H₂O digeriert. Die wässrige Phase wurde 30 min bei 3000 g zentrifugiert. 30–50 µl des wässrigen, mit H₂O auf 25 ml gebrachten Überstandes wurden jeweils dünnschichtelektrophoretisch [3, 14, 15] auf Chromon- bzw. Eriodictyol-glykosid getestet.

Herstellung der Enzympräparationen. 5 g Frischpflanzen wurden mit 10 g Quarzsand, 30 ml K-phosphatpuffer (0,1 M pH 7,5) und 20 µl Mercaptoäthanol 10 min im Mörser zerrieben und das Homogenat 30 min bei 100000 g zentrifugiert (= Rohsaft). Anschließend wurde mit gereinigtem Dowex 1 × 2 (200–400 mesh, Cl⁻-Form. PO₄³⁻-äquilibriert) 30 min

gerührt (1 g Dowex/10 g Frischgewicht) und durch Glaswolle filtriert. Dann erfolgte eine Ammonsulfatfällung bei 80% Sättigung. Der Niederschlag wurde in Pi-puffer aufgenommen und über Sephadex G-25 medium filtriert (= Sephadexfiltrat). Alle Arbeitsgänge wurden bei 4° ausgeführt.

Enzymtests. 0,5 µMol Eriodictyol- bzw. Eriodictyol-7-rutinosid wurden in 0,25 ml Äthylenglykolmonomethyläther gelöst und nach Zusatz von 5 ml K Pi-puffer (0,1 M pH 7,5) und 3 ml Sephadexfiltrat bei 30° inkubiert. Die Reaktion wurde durch Aufnahme der UV-Spektren im Bereich von 500–220 nm in bestimmten zeitlichen Abständen verfolgt. Die Vergleichsküvetten enthielten den gleichen Ansatz wie die Meßküvette, mit Ausnahme des Substrates. Für den dünnschichtelektrophoretischen Nachweis der Chromonbildung wurden 5 µMol Substrat und 0,3 ml Rohsaft in den obigen Ansatz eingebracht. In bestimmten zeitlichen Abständen wurden 30–50 µl dem Reaktionsansatz entnommen und das Auftreten von 5,7-Dihydroxy chromon-7-rutinosid verfolgt. Der Enzymtest mit Meerrettichperoxidase erfolgte nach der Methode von Bergmeyer [16].

LITERATUR

1. Bourwieg, D. und Pohl, R. (1973) *Planta Med.* **24**, 304.
2. Bourwieg, D., Janistyn, B., Stocker, M. und Pohl, R. (1974) *Arch. Pharmacol.* **307**, 131.
3. Stocker, M. (1975) Dissertation Freiburg.
4. Stocker, M., Janistyn, B. und Pohl, R. (1974) *Arch. Pharmacol.* **307**, 946.
5. Fukushima, S., Noro, T., Saiki, Y., Ueno, A. und Akahori, Y. (1968) *J. Pharm. Soc. (Japan)* **88**, 1135.
6. Pendse, R., Rama Rao, V. und Venkataraman, V. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2033.
7. Romussi, R. und Ciarallo, G. (1974) *Phytochemistry* **13**, 177.
8. Birch, A. J. und Thompson, D. J. (1972) *Austr. J. Chem.* **25**, 2731.
9. Bourwieg, D. (1971) Dissertation Freiburg.
10. Hoffmann, W. (1975) Dissertation Freiburg (im Druck).
11. Hösel, W., Frey, G. und Barz, W. (1974) *Phytochemistry* **14**, 417 (und weitere Literaturangaben).
12. Schreiber, W. (1974) *FEBS Letters* **41**, 50.
13. Schreiber, W. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 509.
14. Pastuska, G. und Trinks, H. (1961) *Chem. Ztg.* **85**, 535.
15. Pastuska, G. und Trinks, H. (1962) *Chem. Ztg.* **86**, 135.
16. Bergmeyer, U., Gawehn, K. und Grassl, M. (1974) *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3. Aufl. Bd. I, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.

Phytochemistry, 1976, Vol. 15, pp 572–573. Pergamon Press Printed in England

TRI-O-METHYLGALANGIN FROM *ANIBA RIPARIA**

NIDIA C. FRANCA, OTTO R. GOTTLIEB,† MAURO T. MAGALHÃES,
PAULO H. MENDES,‡ JOSÉ G. S. MAIA, MIRIAM
L. DA SILVA|| and HUGO E. GOTTLIEB§

† Instituto de Química, Universidade de São Paulo; ‡ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rio de Janeiro; || Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil, and § Department of Chemistry, Rice University, Houston, U.S.A.

(Received 8 October 1975)

Key Word Index—*Aniba riparia*; Lauraceae; tri-O-methylgalangin; 3,5,7-trimethoxyflavone; benzyl benzoate; benzaldehyde.

Plant. *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), trivial name louro, voucher specimen INPA, Manaus, 46.799,

* Part 33 in the series "The Chemistry of Brazilian Lauraceae". For Part 32 see ref. [1]. Sponsored by Ministério do Planejamento through Academia Brasileira de Ciências and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

collected at Ducke Forest Reserve, Manaus, Amazonas.

Trunk wood. Vapour entrainment gave essential oil (0.6%), shown to contain benzyl benzoate (74%), a common constituent of *Aniba* species [2], benzaldehyde (10%) and terpenes by GLC and spectra. Benzene extraction gave a partly crystalline mass (1%) which, upon filt-