

Neue Untersuchungen über Flavonoide in *Viscum album* L. ssp. *abietis*, *album* und *austriacum*

New Investigations on Flavonoids from *Viscum album* L. ssp. *abietis*, *album* and *austriacum*

Elmar Lorch

HELIXOR Heilmittel GmbH & Co.,
D-W-7463 Rosenfeld, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **48c**, 105–107 (1993);
received December 14, 1992

Viscum album, Mistletoe, HPLC, Flavonoids,
Sakuranetin

Hydrolyzed alcoholic extracts of *Viscum album* L. were analyzed by HPLC for their flavonoid content. Besides the known flavonoid aglyca 4',5,7-trihydroxy-3'-methoxyflavanone (homoeiodictyol), 5,7-dimethoxy-4'-hydroxyflavanone, 3'-methylquercetin (isorhamnetin) and 3',7-dimethylquercetin (rhamnazin) another flavanone derivate, 4',5-dihydroxy-7-methoxyflavanone (sakuranetin) was detected in mistletoe extracts for the first time. With the described method it is possible to distinguish the three mistletoe subspecies *abietis*, *album* and *austriacum*.

Die Flavonoide der europäischen Mistel, *Viscum album* L., sind bereits mit verschiedenen Methoden und zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen untersucht worden. Becker und Exner [1] fanden in hydrolysierten alkoholischen Extrakten per Dünnschichtchromatographie Quercetin und höher methylierte Derivate, während Fukunaga und Mitarbeiter [2, 3] in Mistelextrakten überwiegend Flavonoidglycoside vom Flavanon- und Chalkon-Typ nachweisen konnten.

Bei den meisten der auf dem Markt befindlichen Mistelpräparaten zur adjuvanten Tumorthherapie wird eine Unterscheidung hinsichtlich des Wirtsbaums vorgenommen. Wir haben deshalb die Frage der Unterscheidbarkeit von Mistelextrakten anhand des Flavonoid-Musters erneut aufgegriffen und mittels quantitativer Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) die in hydrolysierten methanolischen Extrakten überwiegend vorkommenden Flavonoide als Aglykone bestimmt sowie in unsicheren Fällen in ihrer chemischen Struktur aufgeklärt. Untersucht wurden die drei Mistel-Subspezies *abietis* (Wirtsbaum Weißtanne, *Abies alba*

Mill.), *album* (Wirtsbaum Apfelbaum, *Malus sylvestris* (L.) Mill.) und *austriacum* (Wirtsbaum Kiefer, *Pinus silvestris* L.).

Abb. 1 zeigt die Strukturformeln der Flavonoid-Aglyka, die wir mit dieser Methode in Mistelextrakten quantitativ bestimmen konnten.

Die Flavonoide **2** und **3** wurden isoliert bzw. durch HPLC-MS in ihrer Struktur aufgeklärt. Die Identifizierung von **1**, **4** und **5** erfolgte durch HPLC, wobei der Probe Vergleichssubstanz zugesetzt wurde, sowie durch Vergleich der UV-Spektren mit Diodenarraytechnik.

Glycoside von **1**, **2**, **4** und **5** wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen [1–3, 5] nachgewiesen. Sakuranetin (**3**) ist ein von uns erstmals in Mistelextrakten identifiziertes Flavanon.

In Abb. 2 sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen graphisch dargestellt. Extrakte von Misteln, die zu verschiedenen Jahreszeiten geerntet wurden, zeigen in ihrem Flavonoidgehalt geringe Unterschiede, was in den Diagrammen durch die Fehlerbalken angezeigt wird.

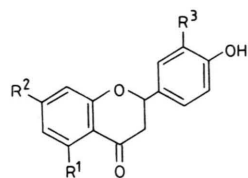
Sakuranetin (**3**) und Rhamnazin (**5**) sind in allen drei Subspezies vorhanden, während Homoeiodictyol (**1**) bzw. 5,7-Dimethoxy-4'-hydroxyflavanon (**2**) als charakteristische Aglykone in Hydrolysaten von *abietis*- bzw. *austriacum*-Extrakten betrachtet werden können.

In den *album*-Extrakten liegt der Gehalt an Flavonoiden generell um ca. Faktor 10 niedriger als in *abietis*- und *austriacum*-Proben.

Bei den ebenfalls nachgewiesenen Kaffeesäure- und Sinapinsäuremethylestern **6** bzw. **7** handelt es sich vermutlich um während der Extraktion/Hydrolyse entstandene Umwandlungsprodukte der in *Viscum album* vorhandenen Phenylpropanglycoside.

Die beschriebene Methode ermöglicht es, durch Vergleich der HPLC-Chromatogramme und Charakterisierung der Peaks durch ihre UV-Spektren eine Unterscheidung der drei Subspezies *abietis*, *album* und *austriacum* von *Viscum-album*-Extrakten vorzunehmen und ist somit für die pharmazeutische Praxis im Rahmen der Wareneingangskontrolle geeignet.

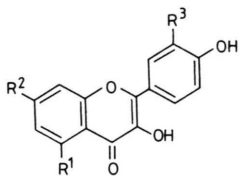
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fukunaga und Mitarbeitern [2, 3] überwiegen in den von uns untersuchten Mistelextrakten Flavonoide vom Flavanon-Typ, neben kleineren Anteilen der Quercetinderivate **4** und **5**.



1: $R^1 = R^2 = \text{OH}$; $R^3 = \text{OCH}_3$
(Homoeriodictyol)

2: $R^1 = R^2 = \text{OCH}_3$; $R^3 = \text{H}$
(5,7-Dimethoxy-4'-hydroxyflavanon)

3: $R^1 = \text{OH}$; $R^2 = \text{OCH}_3$; $R^3 = \text{H}$
(Sakuranetin)

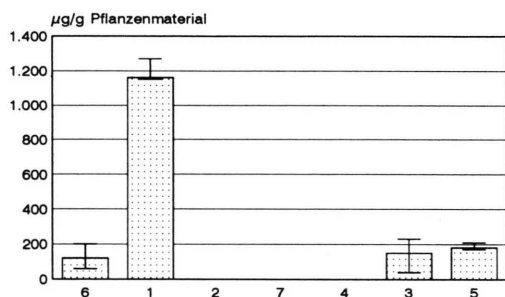


4: $R^1 = R^2 = \text{OH}$; $R^3 = \text{OCH}_3$
(Isorhamnetin)

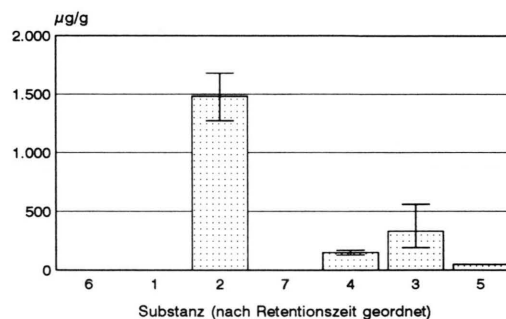
5: $R^1 = \text{OH}$; $R^2 = R^3 = \text{OCH}_3$
(Rhamnazin)

Abb. 1. Strukturformeln der Flavonoid-Aglyka, in hydrolysierten Extrakten von *Viscum album* mittels quantitativer HPLC bestimmt.

a) abietis



c) austriacum



b) album

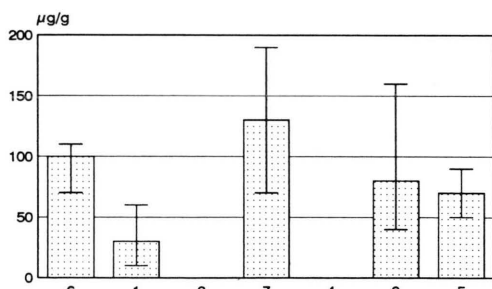


Abb. 2. Gehalte an Flavonoid-Aglykonen in hydrolysierten Mistelextrakten der Subspezies *abietis*, *album* und *austriacum*. Die Fehlerbalken zeigen die Schwankungen der Gehalte von Extrakten der verschiedenen Erntezeitpunkte.

Material und Methoden

UV-Spektroskopie

Die Spektren wurden in Methanol im Bereich von 220–500 nm in 1-cm-Quarzküvetten aufgenommen. Die Herstellung der Shift-Reagenzien erfolgte nach Markham [6].

HPLC

Trennsystem: Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) 125 × 4,0 mm (Merck); Fließmittel: A = Orthophosphorsäure 0,5%, B = Methanol, Gradient von 30% auf 100% B in 30 min. Flußrate: 1,0 ml/min. Probemenge: 10 µl.

Quantitative Bestimmung: Als externe Standards wurden Hesperetin (für Flavanone) bzw. Quercetin (für Flavonole) verwendet; Detektionswellenlängen: 290 nm resp. 340 nm.

Extraktion

Zerkleinerte tiefgefrorene Misteln (Blätter, Früchte, Blüten und Stengel (bis zu 2½ Verzweigungen)) wurden mit 80-proz. Methanol heiß extrahiert, das Lösungsmittel i. V. entfernt und der Rückstand mit 6-proz. Salzsäure 1 h unter Erhitzen hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit Ether erschöpfend extrahiert, der Ether i. V. entfernt und der Rückstand mit Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde, ggf. nach Verdünnung, zur HPLC verwendet.

Herkunft der Vergleichssubstanzen

Hesperetin, Homoeriodictyol (1), Isorhamnetin (4), Quercetin und Sinapinsäure: Fa. Roth, Karlsruhe; Sakuranetin (2) und Rhamnazin (5): Prof. Dr. R. Mues, Universität Saarbrücken. Kaffeesäuremethylester: synthetisiert aus Kaffeesäure.

Herkunft des Pflanzenmaterials

Wildwachsende Misteln wurden im Frühjahr, Sommer, Herbst und Winter von den Wirtsbäumen Tanne, Apfelbaum und Kiefer im süddeutschen Raum in den Jahren 1989–1991 geerntet.

Zerkleinertes, tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wird bei der Firma Helixor GmbH & Co. aufbewahrt.

Identifizierung von 2 und 3

5,7-Dimethoxy-4'-hydroxy-flavanon (2): Die Substanz wurde durch Extraktion von *Viscum album* ssp. *austriacum* mit Wasser und Umkristallisation des erhaltenen Niederschlags aus EtOH/H₂O in Form hellgelber Nadeln erhalten, Fp. 170 °C.

UV (λ_{\max} in nm): MeOH 282, 317(sh); MeOH + NaOH 285, 430; MeOH + AlCl₃ 282, 317(sh). – MS *m/z* (%): 300 (81) (M⁺), 207 (21), 181 (100), 180 (59), 152 (29), 120 (23) (zur Interpretation vgl. [7]).

Sakuranetin (3): UV (λ_{\max} in nm): MeOH 285, 325(sh); MeOH + NaOH 285, 430; MeOH + AlCl₃ 308, 365. Die endgültige Identifizierung erfolgte durch Particle-Beam HPLC/MS; die MS-Daten des entsprechenden HPLC-Peaks waren mit denjenigen der Vergleichssubstanz sowie den Angaben in der Literatur [8] identisch: MS *m/z* (%): 286 (68) (M⁺), 285 (50), 193 (36), 180 (42), 167 (100), 166 (32), 138 (32), 120 (42).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Mues, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, danken wir für die Überlassung der Vergleichssubstanzen.

- [1] H. Becker und J. Exner, Z. Pflanzenphysiol. **97**, 417 (1980).
- [2] T. Fukunaga, I. Kajikawa, K. Nishiya, Y. Watanabe, N. Suzuki, K. Takeya und H. Itokawa, Chem. Pharm. Bull. (Japan) **36**, 1185 (1988).
- [3] T. Fukunaga *et al.*, *ibid.* **35**, 3292 (1987).
- [4] K. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. IV, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart 1966.

- [5] N. Ohta und K. Yagishita, Agr. Biol. Chem. (Japan) **34**, 900 (1970).
- [6] K. R. Markham, Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London 1982.
- [7] J. B. Harborne (Hrsg.), The Flavonoids, Chapman & Hall, London 1975.
- [8] E. L. Ghisalberti, P. R. Jefferies, R. Lanteri und J. Matison, Experientia **34**, 157 (1978).