Biflavonoide aus *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)

Biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)

Gisela Skopp und Gerhard Schwenker*

Pharm.-Chem. Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364,
D-6900 Heidelberg

Egon Stahl in großer Dankbarkeit zum Gedenken

Z. Naturforsch. **41b**, 1479–1482 (1986); eingegangen am 4. Juni 1986

Schinus terebinthifolius Raddi, Anacardiaceae, Tetrahydroamentoflavin, Dihydroamentoflavin, Amentoflavin

Three biflavonoids together with gallic acid have been isolated for the first time from the drupes of *S. terebinthifolius*. They have been characterized through chemical and spectral data.

Einleitung

Bei *Schinus terebinthifolius* Raddi handelt es sich um eine in Brasilien und Paraguay heimische Anacardiacee. Ihre Steinfrüchte gelangten erst vor wenigen Jahren unter der Bezeichnung „Rosa Pfeffer“ oder „Rosa Beeren“ auch bei uns in den Handel und werden vorzugsweise in der „Nouvelle Cuisine“ verwendet. Aufgrund chemotaxonomischer Gesichtspunkte sowie einer entzündlichen Wirkung auf die Haut [1] ging man zu Recht von der Annahme aus, das Gewürz enthalte langkettige Phenole [2]. Volksmedizinische Anwendungen der Droge bei Wunden und Geschwüren lassen sich mit diesen Befunden nicht erklären [3].

Material und Isolierung

Die gefriergetrockneten Steinfrüchte von *S. terebinthifolius* stammten von der Fa. Carla (Saarbrücken), das Herkunftsland ist die Insel Reunion. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich von aus der Ware nicht ausgelesenen Blattstücken mit Herbarmaterial, eine Bestimmung anhand der Früchte allein ist sehr unsicher.

Die lipophile Fraktion eines Acetonextraktes von 500 g zerkleinerten Früchten wurde durch Schütteln zwischen gleichen Volumina Petrolether (40–60 °C) und MeOH, das mit 2% H₂O versetzt war, verteilt. Die Petroletherphase enthält unter anderem *n*-Alkylphenole, über deren Isolierung und Identifizierung an anderer Stelle berichtet werden soll. Der Methanolauszug wurde eingeeengt, der zähflüssige Rückstand mehrmals mit warmem Wasser gewaschen, mit Ether erschöpfend ausgeschüttelt, und

der Etherextrakt eingeeengt. Ausbeute: 4,3 g Rohextrakt (entspr. 0,86% Trockendroge). Wäßrige (A) und etherische (B) Phase wurden papierchromatographisch untersucht. Aus A konnte durch Ausschütteln mit Ethylacetat und dreimaliges Umkristallisieren aus MeOH/H₂O 1:1 Gallussäure isoliert werden. B wurde säulenchromatographisch (S1) aufgetrennt, und die einzelnen Fraktionen mittels DC (TEF) überprüft. Neben wenig Gallussäure erhielten wir drei weitere Verbindungen, die jeweils an S2 vollständig aufgereinigt werden konnten.

Ausbeuten: Tetrahydroamentoflavin (**1**) 280 mg (entspr. 0,056%), II-2,3-Dihydroamentoflavin (**2a**) 6 mg (entspr. 0,0012%), Amentoflavin (**3**) 34 mg (entspr. 0,0068%), Gallussäure 420 mg.

Die Reihenfolge der identifizierten Verbindungen entspricht der Reihenfolge ihrer Elution (S1). Die Identifizierung erfolgte durch UV-Spektroskopie mit und ohne Shift-Reagenzien, durch MS, ¹H- und ¹³C-NMR sowie Bestimmung der Schmelzpunkte.

Analyt. Chromatographie: a) PC Whatman 3 MM, Fließmittel 1. Dimension TBA (*tert*-BuOH/HOAc/H₂O 3:1:1, obere Phase), 2. Dimension 15% HOAc, Detektion: UV 365 nm, NH₃/UV 365 nm.

b) Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,25 mm, Fließmittel TEF (Toluol/Ameisensäureethylester/HCOOH 5:4:1), Detektion: UV 365 nm, Echtblausalz B.

Säulenchromatographie: S1: Ø 3,5 cm, Länge 100 cm, 150,0 g Polyamid-SC6, Korngröße 0,05 bis 0,16 mm, der Fa. Macherey und Nagel (Düren), Elutionsmittel: CH₂Cl₂/EtOH/Methylethylketon/Aceton 30:20:5:1 mit einer jeweils um 5 Anteile sinkenden Konzentration von CH₂Cl₂ pro 1 bis CH₂Cl₂/EtOH/Methylethylketon/Aceton 10:20:5:1, Tropfgeschwindigkeit 1 ml/min. S2: Ø 2 cm, Länge 22 cm, 20,0 g Sephadex der Fa. Pharmacia Fine Chemicals (Freiburg), Elutionsmittel: MeOH, Tropfgeschwindigkeit 0,2 ml/min.

Schmp.: Kofler-Heiztischmikroskop der Fa. Reichert (Wien).

* Sonderdruckeranforderungen an Prof. Dr. Gerhard Schwenker.

Spektren: UV: Spektralphotometer DMR 10 der Fa. Zeiss (Oberkochen). – MS: Massenspektrometer der Fa. Dupont Instruments (Paris), Ionisationsenergie 70 eV. – ^1H - ^{13}C -NMR: WM-250 (250 MHz- ^1H und 62,9 MHz- ^{13}C) der Fa. Bruker (Karlsruhe). Alle Spektren wurden in $\text{DMSO}-d_6$ aufgenommen mit TMS als internem Standard.

Gallussäure

Ein Vergleich der isolierten Verbindung mit einer authentischen Probe ergab übereinstimmende Daten (MS, ^1H -NMR, Mischschmelzpunkt).

Amentoflavin

3 wurde als leuchtend gelbes Pulver erhalten. Schmp. 259 °C. Die Identität von **3** mit Amentoflavin wurde bestätigt durch Übereinstimmung der ^1H -NMR- und UV-Daten sowie durch Co-Chromatographie mit einer authentischen Probe (Amentoflavin, Fa. Roth, Karlsruhe). Der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression. Amentoflavin wurde auch aus *Toxicodendron radicans* O. Ktze. isoliert [4].

3

Tetrahydroamentoflavin

1 wurde als beigefarbenes, feinkristallines Pulver erhalten und ergab einen positiven Shinoda- sowie einen negativen Pew-Test. Schmp.: 236 °C (Zers.). Die Substanz war bereits in den Früchten von *Semecarpus anacardium* L., *S. prainii* King [5, 6] und auch in den Früchten von *Toxicodendron radicans* O. Ktze. [4], alles Vertreter der Anacardiaceae, aufgefunden worden. UV-, MS-, ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von **1** stimmten mit den Literaturdaten überein. Eine weitere Bestätigung lieferte das Hexa-Acetat, das nach

der üblichen Standardmethode dargestellt worden war. Schmp.: 131 °C. – MS (70 eV, 285 °C): m/z (%) = 794 (3,9, M^+), 752 (16,5), 710 (44,7), 668 (63,9), 626 (64,5), 584 (20,9), 541 (7,0), ...

1

Dihydroamentoflavin

2a wurde als hellgelbes, feinkristallines Pulver erhalten und ergab dieselben Farbreaktionen wie **1**. Schmp.: 212 °C.

UV (λ_{max}): MeOH 287, 325 Sch; NaOMe 290 Sch, 323, 395; AlCl_3 280, 307, 352, 380 Sch; AlCl_3/HCl 278, 312, 358, 390 Sch; NaOAc 290, 315, 385; NaOAc/ H_3BO_3 285, 330.

MS (70 eV, 400 °C): m/z (%) = 540 (90, M^+), 522 (50), 402 (30), 388 (40), 376 (30), 370 (30), 362 (100), 268 (10), ...

^1H -NMR: δ = 13,17 (s, 1H, I 5-OH), 12,15 (s, 1H, II 5-OH), 9,7–11,2 (br., 4H, I 7-OH, 4'-OH, II 7-OH, 4'-OH), 7,62 (d, 2H, II 2'-H, 6'-H, J = 9 Hz), 7,50 (d, 2H, I 2'-H, J = 2 Hz), 7,37 (dd, 1H, I 6'-H, J = 9 und 2 Hz), 6,93 (d, 1H, I 5'-H, J = 9 Hz), 6,78 (d, 2H, II 3'-H, 5'-H, J = 9 Hz), 6,13 (s, 1H, II 6-H), 5,88 (s, 2H, I 6-H, 8-H), 5,48 (dd, 1H, II 2-H, J = 12 und 4 Hz) ppm.

^{13}C -NMR: δ = I 163,0 (C-2), II 78,6 (C-2); I 101,8 (C-3), II –; I 181,3 (C-4), II 196,3 (C-4); I 160,5 (C-5), II 162,6 (C-5); I 100,2 (C-6), II 95,6 (C-6); I 163,0 (C-7), II 166,5 (C-7); I 94,9 (C-8), II 106,1 (C-8); I 156,9 (C-9), II 159,8 (C-9); I 103,6 (C-10), II 101,6 (C-10); I 121,3 (C-1'), II 128,0 (C-1'); I 127,8 (C-2'), II 126,7 (C-2'); I 121,6 (C-3'), II 115,6 (C-3'); I 160,2 (C-4'), II 156,9 (C-4'); I 117,0 (C-5'), II 115,6 (C-5'); I 131,2 (C-6'), II 126,7 (C-6') ppm.

2a

2b

2b ist in der Literatur beschrieben [7]. Zur Unterscheidung soll **2a** mit II-2.3-Dihydroamentoflavin bezeichnet werden.

Diskussion

Im Zuge eines Screenings der wäßrig-methanolischen Fraktion von *Schinus*-Früchten konnten Flavonoid-Aglyca nachgewiesen werden. Die präparative Isolierung wurde an einer Polyamid-Säule durchgeführt, eine Gradientenelution erwies sich als vorteilhaft. Durch eine anschließende Aufreinigung an Sephadex LH-20 konnten **1**, **2a** und **3** in dünn-schichtchromatographisch reiner Form erhalten werden. **1** und **3** sind erst in den letzten Jahren aus drei weiteren Anacardiaceen isoliert worden, **2a** ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden.

Bei **2a** gab zunächst ein positiver Shinoda-Test den Hinweis, es könne sich um ein Flavanon handeln. Dies wurde durch das UV-Spektrum bestätigt, bathochrome Shifts bei Anwesenheit von NaOAc und AlCl_3 deuten außerdem auf eine 5,7-OH-Substitution hin [8]. Das Massenspektrum von **2a** zeigt den Molpeak bei m/z 540 und bestätigt die Vermutung, insbesondere nach der vorausgegangenen Identifizierung von **1** und **3**, es handle sich um ein Biflavonoid mit einem Apigenin- und einem Naringenin-Teil. Die fast vollständige Übereinstimmung des Schmelzpunktes [7] und der UV-Daten [9] von **2b** mit **2a** ließ zunächst an eine Identität beider Verbindungen denken. Bestimmte Fragmente des Massenspektrums sprachen jedoch dagegen. Somit stellte sich zum einen die Frage, ob tatsächlich eine I3'–II8-Verknüpfung vorliegt, zum anderen, ob es sich bei I um Apigenin handelt.

Die hohe Intensität des Ions **4** deutet auf die Bildung einer Dibenzofuranverbindung unter Abspaltung von Wasser aus dem Molekül hin, wie dies auch bei **1** und **3** der Fall ist. Dies läßt den Schluß auf eine mögliche I8–II8-, I6–II8-, I3'–II8- oder I3'–II6-Verknüpfung zu. Das Bruchstück **5** entsteht dann aus **4** durch einen Retro-Dien-Zerfall. Weitere wichtige Fragmente sind **7** und **8**, wobei **6** und **7** aus **2a** durch ein- bzw. zweimalige RDA-Reaktion hervorgehen. **7** schließt die beiden erstgenannten Verknüpfungsmöglichkeiten aus, während **5**, **7** und **8** beweisen, daß I nicht der Flavanon-Teil sein kann.

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt zwei Signale für zwei 5-OH-Gruppen bei $\delta = 13,17$ und $12,15$, ein Singulett für ein Proton bei $\delta = 6,13$ und ein Singu-

lett für zwei Protonen bei $\delta = 5,88$; die Flavonoid-Hälften sind über einen A- und einen B-Ring miteinander verknüpft. Dies wird zusätzlich bestätigt durch sieben aromatische Protonen, die den beiden B-Ringen zuzuordnen sind. Vier dieser Protonen erscheinen als zwei Paare von Dubletts, ihre Kopplungskonstante von 9 Hz entspricht der orthoständiger H-Atome.

Obwohl es nahelag, auch bei **2a** eine I3'–II8-Verknüpfung anzunehmen, konnte mit den vorliegenden Daten eine I3'–II6-Verknüpfung nicht sicher ausgeschlossen werden. Aufgrund der geringen Substanzmenge sollte ein ^{13}C -NMR-Spektrum dieses Problem lösen.

Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Signallagen von Naringenin und Apigenin [10] mit den Werten von **2a** zeigte, daß das Signal von II8 um 11 ppm und das von I3' um 5,4 ppm zu tieferem Feld verschoben war, während die Resonanzen von I2' und I4' so-

wie II 7 und II 9 bei etwas höherem Feld lagen (0,4–2,0 ppm). Die Struktur von **2a** als II-2,3-Dihydroamentoflavon ist damit bewiesen.

Die spasmolytische Eigenschaft der Biflavonoide ist schon lange bekannt [11]. Amentoflavon erwies sich als starker Inhibitor der *c*-GMP- und *c*-AMP-Phosphodiesterasen, wobei die erforderlichen Dosen um das 5- bis 10-fache niedriger lagen als beim Papaverin [12]. Monomere zeigten eine sehr viel geringere Aktivität, so auch bei einer Untersuchung auf cytostatische und cytotoxische Wirkungen verschiedener Flavonoide auf Hepatom-Zellen [13], bei der sich Biflavonoide als sehr wirkungsintensiv erwiesen. Die Literaturstellen über *S. terebinthifolius* sind sehr begrenzt, die meisten berichten von hautreizender und entzündlicher Wirkung [14, 15]. Dies mag auch

begründet sein durch den hohen Anteil an ätherischem Öl in den Früchten und dem Vorkommen von *n*-Alkylphenolen. Weit weniger erklärbar ist so die Behandlung von Tumoren mit Schinus-Früchten in der Volksmedizin; ihre Verwendung zu Bädern bei Wunden und Geschwüren, die auch hierzu im Widerspruch zu stehen scheint, findet ihre Erklärung darin, daß Flavonoide und Gallussäure aufgrund ihrer hydrophileren Natur vorrangig wirksam werden.

Für die Überlassung von Herbarmaterial von *Schinus terebinthifolius* Raddi danken wir Frau J. F. Morton, Florida, und der Botanischen Staatssammlung München.

-
- [1] L. Lewin, Gifte und Vergiftungen, 5. Auflage, S. 684, Haug Verlag, Ulm 1962.
 - [2] E. Stahl, K. Keller und C. Blinn, *Planta Medica* **48**, 5 (1983).
 - [3] P. H. List und L. Hörhammer, *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 4, S. 315, Springer Verlag, Heidelberg 1972.
 - [4] M. A. ElSohly, J. C. Craig, C. W. Waller und C. E. Turner, *Phytochemistry* **17**, 2140 (1978).
 - [5] Kh. Ishratullah, W. H. Ansari und W. Rahman, *Ind. J. Chem.* **15 B**, 615 (1977).
 - [6] I. Ahmad, Kh. Ishratullah, M. Ilyas, W. Rahman, O. Seligmann und H. Wagner, *Phytochemistry* **20**, 1169 (1981).
 - [7] H. Geiger und W. De Groot Pfeleiderer, *Phytochemistry* **10**, 1936 (1971).
 - [8] T. J. Mabry, K. R. Markham und M. B. Thomas, *The Systematic Identifications of Flavonoids*, S. 48, Springer Verlag, New York 1970.
 - [9] S. F. Dossaji, T. J. Mabry und J. W. Wallace, *Rev. Latinamer. Quim.* **6**, 37 (1975).
 - [10] V. M. Chari, M. Ilyas, H. Wagner, A. Neszmelyi, F. Chen, Y.-C. Lin und Y.-M. Lin, *Phytochemistry* **16**, 1273 (1977).
 - [11] L. Hörhammer, H. Wagner und H. Reinhardt, *Z. Naturforsch.* **22b**, 768 (1967).
 - [12] A. Beretz, M. Joly, J. C. Stoclet und R. Anton, *Planta Medica* **36**, 193 (1979).
 - [13] M. Joly, J. P. Beck, M. Haag-Berrurier und R. Anton, *Planta Medica* **39**, 230 (1980).
 - [14] J. F. Morton, *Economic Botany* **32**(4), 353 (1978).
 - [15] L. Roth, M. Daunerer und K. Kormann, *Giftpflanzen, Pflanzengifte*, S. 17, Economed Verlag, München 1984.