

## Notizen

**Bildung und [<sup>14</sup>C]-Markierung der Flavonolignane (Silymarin) bei *Silybum marianum* (Haller)**

Biosynthesis and [<sup>14</sup>C]Labelling of Flavonolignans (Silymarin) by *Silybum marianum* (Haller)

J. Hölzl

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre,  
Universität München

(Z. Naturforsch. **29** c, 82–83 [1974]; eingegangen  
am 28. November 1973)

Flavonolignans, Silymarin

Die Früchte von *Silybum marianum* (Haller) enthalten ein Flavonoidgemisch, aus dem bisher neben Taxifolin die drei Flavonolignane Silybin<sup>1</sup>, Silydianin<sup>2</sup> und Silychristin<sup>3</sup> isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt wurden. Flavonolignane sollen entsprechend ihrer Struktur durch Kondensation aus Taxifolin und Coniferylalkohol entstehen. Problematisch für Biosyntheseuntersuchungen war bisher die Pflanzengröße von 2 bis 3 m. Durch Kultivierung unter besonderen Gewächshausbedingungen erhielt man Pflanzen zwischen 30 und 50 cm Höhe. Obwohl bei den Gewächshauspflanzen die Zeitdauer der Fruchtbildung gegenüber Pflanzen im Freiland verlängert und das Gesamtgewicht der Früchte pro Blütenstand vermindert war, war der Gehalt der Flavonolignane und ihre prozentuale Zusammensetzung nicht beeinträchtigt.

Um erste Hinweise auf den postulierten Biosyntheseweg und die Rolle des Taxifolins zu erhalten, wurde [1-<sup>14</sup>C]Acetat an Silybumpflanzen appliziert und die Gesamt- und die spezifischen Radioaktivitäten aller Flavonoide bestimmt. Das [1-<sup>14</sup>C]Acetat verfütterte man zu drei verschiedenen Zeitpunkten und zwar 10, 20 und 25 Tage nach Blühbeginn mittels Dochtmethode. Bei einer Fruchtbildungsperiode von insgesamt 30 Tagen betrug damit die Inkorporationszeiten 20, 10 und 5 Tage. Nach dem Ausreifen der Früchte wurden diese pulverisiert, mit Petroläther die Lipide und mit Methanol die Flavonoide extrahiert<sup>4</sup>. Zum Nachweis der [<sup>14</sup>C]Markierung der einzelnen Flavonoide wurde der Methanol-Extrakt dünnstschichtchromatographisch mit den Fließmitteln a. Chloroform-Aceton-Ameisensäure

9:2:1, und b. Dichloräthan-Äthylacetat-Eisessig 80:10:10 auf Fertigplatte Kieselgel F<sub>254</sub> 60 (Merck, Darmstadt) oder mit c. Chloroform-Methyläthylketon-Methanol-Ameisensäure 60:20:14:5 auf Polyamid-Platten aufgetrennt<sup>5</sup>. Von den Dünnschichtchromatogrammen, die man mit den 3 Verfahren erhielt, fertigte man mit Röntgenfilmen Structurix D 10 (Fa. Gaevert, Belgien) Autoradiogramme an. Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität wurden die Flavonoide aus dem Methanolextrakt durch chromatographische Verfahren rein isoliert und die Radioaktivität dieser Verbindungen gemessen. Die Konzentration der Flavonoide ermittelte man durch Messung der Extinktion bei 287 nm unter Einsatz von Standardsubstanzen.

Tab. I zeigt die Verteilung der [<sup>14</sup>C]Radioaktivität auf die Neutralfett- und Flavonfraktion und den Rückstand bei den drei verschiedenen Inkorporationszeiten. Den höchsten Gesamtradioaktivitätsgehalt mit nahezu 8% des applizierten [<sup>14</sup>C]Acetats ermittelte man in den Früchten mit der Einbauzeit von 20 Tagen, bei einer Inkorporationszeit von 10 Tagen war der Anteil 6% und nur 0,02% bei der

Tab. I. Radioaktivitätsverteilung in *Silybum*-Früchten nach verschiedenen Einbauzeiten.

Einbauzeit [d]	5 [μCi]	10 [μCi]	20 [μCi]
Dichlormethanfraktion (Neutralfette)	0,10	28	20
Methanolauszug	0,05	20	22
davon Flavonoide	0,02	16	12
Rückstand	0,10	13	37
% der appl. Rad.	0,02	6,1	7,9

Pro Blütenstand wurden 1 mCi [1-<sup>14</sup>C]Acetat in 1 ml Wasser appliziert.

Applikation 5 Tage vor Fruchtreifung. Wie weitere Untersuchungen ergaben, war die Hauptmenge der applizierten Radioaktivität im Stengel und im Blütenboden festgehalten worden. Die höchste Markierung der Flavonoidfraktion erzielte man durch eine Applikation 10 Tage vor der Fruchtreifung. Dabei wurde ca. 1,2% des [<sup>14</sup>C]Acetats in die Flavonoide inkorporiert. Die Flavonolignane und die Neutrallipide gehören damit zu den Verbindungen, die in einem späten Abschnitt der Fruchtbildung synthetisiert werden. Bei der Applikation 5 Tage vor der

Sonderdruckanforderungen an Dr. J. Hölzl, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, D-8000 München 2, Karlstr. 29.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Fruchtreifung war der Einstrom der Radioaktivität nur noch gering. Die Früchte waren zu diesem Zeitpunkt schon voll ausgebildet, waren jedoch noch nicht vollständig pigmentiert. Die meßbaren Radioaktivitäten in den untersuchten Verbindungen lassen jedoch auch zu diesem Zeitpunkt noch auf eine Flavonoidbiosynthese schließen.

Mit Hilfe der Autoradiographie konnte nachgewiesen werden, daß alle Flavonoide radioaktiv markiert waren. Neben den Flavonoiden waren die Neutrallipide in der Fließmittelfront und nicht näher identifizierte Verbindungen am Startpunkt markiert. Die spezifischen Aktivitäten der Flavonoide sind in Tab. II aufgeführt. Während erwartungsgemäß die Werte bei der Einbauzeit von 5 Tagen sehr niedrig lagen, hatten die spezifischen Aktivitäten nach 10

Tab. II. Spezifische Aktivitäten und Gehalt der Flavonoide in den Silybumfrüchten.

Einbauzeit [d]	5	10	20	Gehalt [mg/100 g Früchte]
	[dpm · 10 <sup>-3</sup> /μM]			
Silybin	20	301	202	440
Dehydro-Silybin	21	348	217	170
Silydianin	46	485	231	1260
Silychristin	18	298	255	290
Taxifolin	11	209	143	740

Pro Blütenstand wurden 1 mCi [<sup>14</sup>C]Acetat in 1 ml Wasser appliziert.

Tagen Einbau bis zu doppelt so hohe Zahlen wie nach 20 Tagen. Silydianin hatten bei diesen Pflanzen mit 485 000 bzw. 46 000 dpm/μM bei Applikation 10 bzw. 5 Tage vor Fruchtreifung die höchsten Werte. Die spezifischen Aktivitäten der 3 übrigen

Flavonolignane waren wesentlich niedriger und untereinander ähnlich hoch. Bei der Applikation 20 Tage vor der Fruchtreifung zeigte zwar das Silychristin die höchste spezifische Aktivität, die Werte der übrigen Verbindungen waren jedoch in der gleichen Größenordnung. Die spezifischen Aktivitäten des Taxifolins waren innerhalb der Flavonoide immer am niedrigsten; daraus kann gefolgert werden, daß dieses Flavonoid nicht die Vorstufe der drei Flavonolignane ist bzw. ein frei vorkommendes Taxifolin nicht in Flavonolignane übergeführt wird. Die spezifischen Aktivitäten deuten vielmehr darauf hin, daß alle Flavonoide eine gemeinsame Vorstufe haben, aus der sie bei der Ausreifung gebildet werden. Um die Verteilung der Radioaktivität in den Flavonolignane zu ermitteln, wurde chromatographisch isoliertes Silybin mit konstantem spezifischem Gewicht durch die Pyridinhydrobromidschmelze abgebaut<sup>6</sup>. Im Abbauprodukt wurden dünn-schichtchromatographisch vier gelbfluoreszierende markierte Substanzen nachgewiesen, wobei eine als Quercetin identifiziert wurde. Nach Abtrennung dieses Quercetins mittels präparativer Dünn-schichtchromatographie wurde eine spezifische Aktivität ermittelt, die mit der des eingesetzten Silybins genau übereinstimmte. Damit ist nachgewiesen, daß die gesamte Radioaktivität im Flavongrundkörper enthalten war.

Durch die relativ hohe Inkorporation des markierten Acetats in die Flavonoide ist diese *in vivo* Verfahren geeignet [<sup>14</sup>C]Flavonolignane zu präparieren. Die Höhe der spezifischen Aktivitäten dieser Verbindungen läßt eine Klärung analytischer und pharmakokinetischer Probleme erwarten.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg.

<sup>1</sup> A. Pelter u. R. Hänsel, Tetrahedron Letters [London] **25**, 2911 [1968].

<sup>2</sup> D. J. Abraham, S. Takagi, R. D. Rosenstein, R. Shiono, H. Wagner, L. Hörhammer, O. Seligmann u. N. R. Farnsworth, Tetrahedron Letters [London] **31**, 2675 [1970].

<sup>3</sup> H. Wagner, O. Seligmann, L. Hörhammer, M. Seitz u. J. Sonnenbichler, Tetrahedron Letters [London] **22**, 1895 [1971].

<sup>4</sup> R. Lipfert u. H. Honerlagen, Dtsch. Apotheker-Ztg. **110**, 873 [1970].

<sup>5</sup> H. Wagner, P. Diesel u. M. Seitz, Arzneimittel-Forsch., im Druck.

<sup>6</sup> V. Prey, Chem. Ber. **74**, 1219 [1941].