
Themenkreis D: Qualitätsmanagement und Pflanzenanalytik

DSL 14 Charakterisierung zweier neuer antioxidativer Tetrahydroxyxanthone in *Hypericum*-Samen und rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Testa



Characterization of Two Novel Antioxidant Tetrahydroxyxanthenes from Hypericum Seeds and Scanning Electronmicroscopic Investigations of their Testa

Peter Lorenz^a, Annerose Heller^b, Marek Bunse^a, Miriam Heinrich^a, Melanie Berger^a, Jürgen Conrad^c, Florian C. Stintzing^a, Dietmar R. Kammerer^a

^aWALA Heilmittel GmbH, Abteilung Analytische Entwicklung & Forschung, Sektion Phytochemische Forschung, Dorfstr. 1, 73087 Bad Boll/Eckwälden, e-mail: peter.lorenz@wala.de

^bUniversität Hohenheim, Institut für Botanik (210), Garbenstraße 30, 70599 Stuttgart

^cUniversität Hohenheim, Chemisches Institut, Bioorganische Chemie (130b), Garbenstraße 30, 70599 Stuttgart

DOI 10.5073/jka.2018.460.014

Zusammenfassung

Hypericum-Samen wurden kürzlich als natürliche Quelle für eine Reihe von Xanthon-Derivaten beschrieben. In Methanol-Extrakten von *H. perforatum* und *H. tetrapterum* konnten per HPLC(DAD)-MSⁿ zwei Hauptkomponenten, die Tetrahydroxyxanthone THX-1 und -2, identifiziert werden, deren genaue Konfiguration bislang unbekannt war. Beide Substanzen wurden deshalb über chromatographische Auftrennung an Polyamid und Kieselgel aus dem Samenextrakt angereichert und mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR-Techniken eine Strukturanalyse vorgenommen. Durch Synthese von THX-1 und -2 und Vergleich ihrer chromatographischen sowie spektroskopischen/spektrometrischen Eigenschaften mit den natürlichen THX in *H. perforatum* wurde die exakte Konfiguration als 1,4,6,7-THX (THX-1) und 1,2,6,7-THX (THX-2) bestimmt. Die beiden neuartigen Verbindungen zeigten eine dreifach stärkere Radikalfängerwirkung im DPPH-Test als das wasserlösliche Vitamin E-Derivat Trolox[®] und sind somit starke Antioxidantien. Ferner konnte durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen (SEM) die zweilagige Struktur der *Hypericum*-Samenschale (Testa) gezeigt werden, wobei die Xanthone wahrscheinlich in der sehr dickwandigen, lignifizierten Sklerenchymschicht eingelagert sind.

Stichwörter: *Hypericum perforatum*, *H. tetrapterum*, Samen, Xanthone, DPPH, SEM.

Abstract

Hypericum seeds have recently been identified as a natural source of different xanthone derivatives. Two main constituents, the tetrahydroxyxanthenes THX-1 and -2, were identified in methanolic extracts of *H. perforatum* and *H. tetrapterum* by means of HPLC(DAD)-MSⁿ methods. However, the exact configuration of both THX was unknown so far. For this reason, the two compounds were enriched by chromatography on polyamide and silica, and the corresponding fraction was investigated by 1D- and 2D-NMR techniques. Based on a tentative structural assignment a total synthesis of THX-1 and -2 was performed. Comparing the chromatographic and spectroscopic/spectrometric features of synthetic THX-1 and -2 with their natural counterparts their exact configuration was determined as 1,4,6,7-THX (THX-1) and 1,2,6,7-THX (THX-2), respectively. The novel compounds exhibited a threefold higher radical scavenging activity in the DPPH assay than the vitamin E derivative Trolox[®]. Hence, they are strong antioxidants. Furthermore, scanning electron microscopy (SEM) provided insights into the two-layer structure of the testa (seed coat), with the thick lignified sclerenchyma layer presumably being the depository of the xanthenes.

Keywords: *Hypericum perforatum*, *H. tetrapterum*, seeds, xanthenes, DPPH, SEM.

Einleitung

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L., im Englischen "St. John's wort") ist eine Arzneipflanze mit traditioneller wie auch aktueller Bedeutung in der Naturheilkunde. Ihr Inhaltsstoff-Spektrum ist

komplex, die Anwendungen der aus oberirdischen Teilen gewonnenen Zubereitungen sind vielfältig. Neben der anti-depressiven Wirkung ihrer Extrakte sind für *H. perforatum* zahlreiche pharmakologische Effekte wie anti-virale, anti-oxidative, antibakterielle und wundheilungsfördernde Wirkungen beschrieben. Die phytomedizinische Bedeutung der Pflanze regte zahlreiche phytochemische wie pharmakologische Untersuchungen an. So dauert die intensive Forschung zu *H. perforatum* nach wie vor an.

Oberirdische Teile von Johanniskraut zeigen ein breites Spektrum an Sekundärstoffmetaboliten, zu deren prominentesten Vertretern die acylierten Phloroglucinole (z.B. Hyperforin und Adhyperforin) und die Naphthodianthrone (wie Hypericin und Pseudohypericin) zählen, neben zahlreichen Flavonoiden. Insbesondere in Wurzeln von *Hypericum*-Arten wurden Xanthone mit einer großen Variabilität an funktionellen Gruppen wie z.B. OH-, MeO-, Prenyl-, Sulfonat- oder Glycosyl-Resten nachgewiesen. Xanthone besitzen ein großes pharmakologisches Potential: einige Vertreter zeigen anti-carcinogene, anti-entzündliche oder neuroprotektive Wirkungen. Bisher nicht erforscht waren hingegen die Inhaltsstoffe der Samen von *Hypericum*. In einer ersten phytochemischen Untersuchung konnten in Methanol-Extrakten von *H. perforatum* und *H. tetrapterum*, dem geflügelten Johanniskraut, neben fettem Öl zahlreiche Xanthone mit den oben genannten funktionellen Gruppen mittels LC-MS bzw. GC-MS nachgewiesen werden (Heinrich et al. 2017). Dabei wurden zwei Tetrahydroxyxanthone (THX-1 und THX-2) als Hauptkomponenten in den Samen detektiert, deren genaue Struktur (Konfiguration) zunächst allerdings unbekannt blieb. Ziel einer weitergehenden Untersuchung sollte folglich sein, die exakte Struktur von THX-1 und -2 aufzuklären und ihre Antioxidans- bzw. Radikalfänger-Wirkung zu ermitteln. Darüber hinaus sollten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen Informationen zum Aufbau der Testa der Samen liefern und erste Hinweise auf die biologische Funktion der THX geben.

Material und Methoden

Zur Isolierung der THX wurden Samen von *H. perforatum* zunächst mit Dichlormethan extrahiert. Der erhaltene Extrakt lieferte nach Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum ein fettes Öl (31.7% bez. auf Samenmasse). Anschließend wurden die entfetteten Samen mit Methanol (MeOH) extrahiert und der MeOH-Extrakt nachfolgend chromatographisch an Polyamid und Kieselgel aufgereinigt (Lorenz et al. 2018). Die dabei stark angereicherten THX-1 und -2 wurden mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR-Methoden (^1H , ^{13}C , HSQC und HMBC) untersucht. Zur abschließenden Strukturaufklärung erfolgte die Synthese von THX-1 und -2 über vier Stufen nach Lorenz et al. (2018). Mit Hilfe einer validierten HPLC-Methode (Heinrich et al. 2017) wurden die Gehalte von THX-1, THX-2 und einer Nebenverbindung THX-3 in den Samen von *H. perforatum* und *H. tetrapterum* bestimmt.

Die synthetisierten THX-1, THX-2 und THX-3 wurden mit dem künstlichen Radikal DPPH in einem photometrischen Test zur Reaktion gebracht und hinsichtlich ihrer Radikalfängerwirkung mit dem wasserlöslichen Tocopherol-Derivat Trolox® verglichen.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen (SEM) erfolgten an einem Zeiss-DSM 940-Rasterelektronenmikroskop nach Sputtern der trockenen ganzen Samen und Bruchstücke mit Gold-Palladium bei 5 kV.

Ergebnisse

Aus den NMR-Daten der chromatographisch angereicherten THX konnte eine erste Strukturanalyse vorgenommen werden. Sie zeigte für THX-1 und THX-2 ein 1,4,6,7- bzw. 1,2,6,7-OH-Substitutionsmuster am Xanthongerüst (s. Strukturformeln, Abb. 1B). Basierend auf diesen Strukturvorschlägen wurden THX-1 und THX-2 synthetisiert. Die synthetisierten Verbindungen wurden per HPLC(DAD)-MSⁿ und GC-MS mit den THX der *Hypericum*-Extrakte verglichen. Diese waren in ihren chromatographischen und spektroskopischen/spektrometrischen Eigenschaften

identisch, wodurch die Konformationsanalyse abgesichert werden konnte. THX-1 und THX-2 waren bisher weder für *Hypericum* noch für andere Pflanzengattungen als Naturstoffe beschrieben. Lediglich die Nebenverbindung THX-3, welche über eine Referenzsubstanz als 1,3,6,7-THX (Norathyriol) identifiziert wurde, ist für *Hypericum* aus der Literatur bekannt. Abb. 1A zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm eines MeOH-Extraktes von *H. perforatum* mit den beiden Hauptxanthonen. Die per HPLC bestimmten THX-Gesamtgehalte (THX-1,-2 und -3) betragen für *H. perforatum*-Samen 1252,07 mg/kg und 265,16 mg/kg für *H. tetrapterum*-Samen (Tab. 1). Das THX-1 : THX-2 –Verhältnis (w/w) war in den Samen beider *Hypericum*-Arten ähnlich und betrug 1 : 1,46 für *H. perforatum* und 1 : 1,49 für *H. tetrapterum*.

Tab. 1 Tetrahydroxyxanthon-Konzentrationen in getrockneten Samen von *H. perforatum* und *H. tetrapterum* (gemessen mittels HPLC(DAD), mit externer Kalibrierung über THX-3 als Referenz, n = 3).

Tab. 1 Concentrations of the tetrahydroxyxanthenes in dried seeds of *H. perforatum* and *H. tetrapterum* (analyzed by HPLC(DAD) based on external calibration with THX-3 as reference compound, n = 3).

Xanthon	<i>H. perforatum</i>	<i>H. tetrapterum</i>
	Gehalt [mg/kg] (Mittelwert; Standardabweichung)	
THX-1	478,41 (± 36,13)	93,49 (± 13,08)
THX-2	700,47 (± 19,02)	139,72 (± 20,90)
THX-3	73,19 (± 2,51)	31,94 (± 0,56)
Gesamt	1252,07	265,16

Die Umsetzung der reinen THX mit dem künstlichen stabilen Radikal DPPH (s. Abb. 1B) zeigte für THX-1 und THX-2 eine IC₅₀ von 7,15 µM und 7,05 µM, bzw. für THX-3 11,19 µM. THX-1 und -2 waren in ihrer Radikalfängerwirkung somit ca. 3x stärker als das wasserlösliche Vitamin E-Derivat Trolox®, mit einer IC₅₀ von 23,22 µM, was die starke Radikalfänger- bzw. Antioxidanswirkung der Titelverbindungen beweist. Interessant ist, dass auch die DPPH-Aktivität methanolischer *Hypericum*-Samenextrakte mit den per HPLC bestimmten THX-Gesamt-Konzentrationen (s. Tab. 1) korreliert (IC₅₀ für *H. perforatum*: 8,7 mg/l und *H. tetrapterum*: 31,9 mg/l), n. Heinrich et al. 2017. Ähnlich den Tocopherolen, die auf zahlreiche Pflanzenöle antioxidativ wirken, könnten die THX *in vivo* eine Schutzwirkung auf die Samenlipide ausüben, was weitere Untersuchungen zeigen sollen.

Durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zusätzlich Informationen zum Aufbau der *Hypericum*-Samen gewonnen werden. Die Dimensionen von *H. perforatum*-Samen betragen ca. 1 mm x 0,5 mm, während *H. tetrapterum*-Samen kleiner sind (0,6 x 0,3 mm). Beide Samen sind länglich und an beiden Enden abgerundet. Außerdem sind eine Raphe (seitliche Naht) und ein Hilum (Samennabel) erkennbar (s. Abb. 2). Die Übersichtsaufnahme eines Samens von *H. perforatum* zeigt die typische netzartige Struktur der äußeren Epidermis, durch die teilweise Abdrücke der darunter liegenden Sklerenchymschicht erkennbar sind (Abb. 2, linkes Bild). In Querbrüchen der Samen (Abb. 2, rechtes Bild) ist die zweilagige Struktur der Testa (Samenschale) zu sehen, die aus der dünnen Epidermis (Ep) und einer dickwandigen Sklerenchymschicht (Sc) mit verstärkten antiklinen Wänden besteht. Aus lichtmikroskopischen Untersuchungen war bekannt, dass das Sklerenchym stark lignifiziert ist und es ist zu vermuten, dass auch weitere phenolische Substanzen, wie die Xanthone (THX) hier lokalisiert sind. Die genaue biologische Funktion der THX in den Samen ist bisher nicht bekannt. Allerdings kann eine Phytoalexin-Wirkung auf mikrobielle oder tierische Pflanzenpathogene vermutet werden – die nachgewiesene Antioxidans-Wirkung liefert hierfür einen Hinweis.

Der Samenertrag von *Hypericum* ist aufgrund der geringen Samengröße minimal, so dass eine pharmazeutische Nutzung ökonomisch eine Herausforderung darstellen dürfte, ein Aspekt der weitergehender Untersuchungen bedarf.

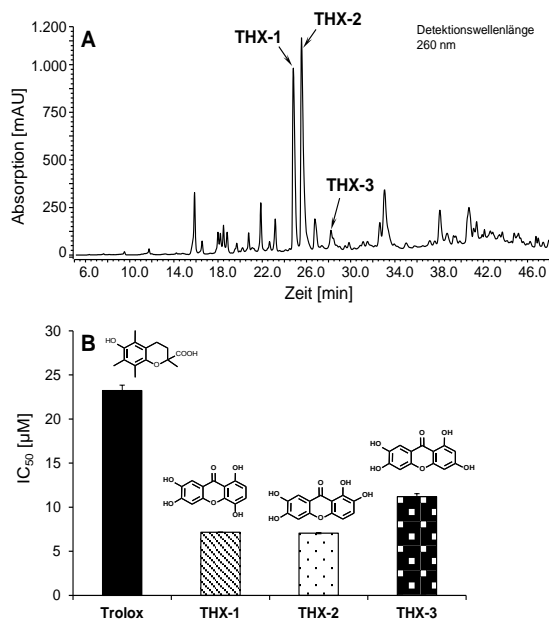


Abb. 1 A) HPLC-Chromatogramm eines Methanol-Extraktes der Samen von *H. perforatum* (Detektionswellenlänge: 260 nm); B) Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) der synthetisierten Tetrahydroxyxanthone (THX-1 bis THX-3) im DPPH-Assay (n = 3) im Vergleich zum wasserlöslichen Vitamin E-Derivat Trolox®.

Fig. 1 A) HPLC chromatogram of a methanol extract from *H. perforatum* seeds (detection wavelength 260 nm). B) Middle inhibitory concentrations (IC₅₀) of the synthesized tetrahydroxyxanthones (THX-1 to THX-3) in the DPPH antioxidant assay (n = 3) in comparison to the water soluble vitamin E derivative Trolox®.

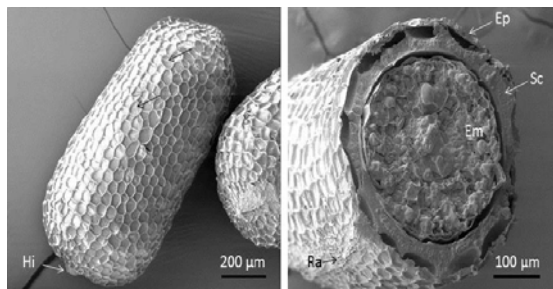


Abb. 2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (SEM) von trockenen *H. perforatum*-Samen. Linkes Bild: Gesamtansicht eines Samens mit dem typischen hexagonalen Netzmuster der äußeren dünnen Epidermis und Abdrücken der darunter liegenden Testaschicht (Sklerenchym, siehe schwarze Pfeile); Hi = Hilum. Rechtes Bild: Samenquerbruch. Erkennbar ist die zweilagige Struktur der Testa (Samenschale) mit äußerer Epidermis (Ep) und lignifizierter Sklerenchymschicht (Sc) sowie dem innenliegenden Embryo (Em), Ra = Raphe.

Fig. 2 Scanning electron micrographs (SEM) of dry seeds of *H. perforatum*. Left picture: Total view of a seed exhibiting the typical hexagonal grid pattern of the epidermal layer with imprints of the secondary layer of the testa (sclerenchyma), see black arrows; Hi = hilum. Right picture: cross fraction of a seed showing the two-layered testa with a thin external epidermal layer (Ep), the lignified sclerenchyma cells (Sc) and the inner embryo (Em); Ra = raphe.

Literatur

- BARNES, J., ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D., 2001. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **53**, 583-600.
- DEMIRKIRAN, O., 2007. Xanthones in *Hypericum*: Synthesis and biological activities. *Topics in Heterocyclic Chemistry*, **9**, 139-178.
- HEINRICH, M., LORENZ, P., DANIELS, R., STINTZING, F.C., KAMMERER, D.R., 2017. Lipid and phenolic constituents from seeds of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum tetrapterum* FR. and their antioxidant activity. *Chemistry and Biodiversity*, **14**, doi: 10.1002/cbdv.201700100.
- LORENZ, P., HELLER, A., BUNSE, M., HEINRICH, M., BERGER, M., CONRAD, J., STINTZING, F.C., KAMMERER, D.R., 2018. Structure elucidation of the main tetrahydroxyxanthones of *Hypericum* seeds and investigation into the testa structure. *Chemistry and Biodiversity*, **15**, doi: 10.1002/cbdv.201800035.
- SZKUDLARZ, P., 2014. Seed morphology and anatomy of *Hypericum elegans* Steph. ex Willd. *Biodiversity Research Conservation*, **35**, 15 – 18.