



Doctoral Thesis

## Isolierung, Analytik und biologische Aktivität von Aminosäuren und Dipeptiden aus *Allium sativum* L.

**Author(s):**

Mütsch-Eckner, Margot C.V.

**Publication Date:**

1991

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000609859> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH Nr. 9462

**Isolierung, Analytik und biologische Aktivität  
von Aminosäuren und Dipeptiden aus  
Allium sativum L.**

ABHANDLUNG  
Zur Erlangung des Titels  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von

MARGOT C. V. MÜTSCH-ECKNER  
eidg. dipl. Apothekerin  
geboren am 13. August 1962  
von Zürich / ZH und Sarnen / OW

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. O. Sticher, Referent  
PD Dr. B. Meier, Korreferent



Zürich 1991

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Aspekte der Isolierung, der Strukturaufklärung, der Analytik und der biologischen Aktivität von genuinen, schwefelhaltigen Inhaltsstoffen aus *Allium sativum* L. behandelt. Alle Aminosäuren sind erstmals aus Knoblauchblättern isoliert worden. (-)-N-(1'-Deoxy-1'-D-fructopyranosyl)-S-allyl-L-cysteinsulfoxid, eine neue Verbindung, die der Klasse der Aminosäureglykoside angehört, besitzt einen signifikant hemmenden Einfluss auf die durch ADP und Adrenalin ausgelöste Thrombozytenaggregation. Zwei HPLC-Methoden wurden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Cysteinderivaten und verschiedenen ubiquitären Aminosäuren entwickelt, eine dritte Methode ermöglichte die Quantifizierung von  $\gamma$ -L-Glutamylpeptiden.

Um eine allgemeine Enzyminaktivierung zu erreichen, wurde das lyophilisierte Pflanzenmaterial mit einem hohen Methanolanteil (80%) in Wasser extrahiert. Nach dem Entfernen der lipophileren Komponenten durch Ausschütteln mit Methylenchlorid wurden die Aminosäuren und Dipeptide mittels chromatographischer Methoden (Ionenaustausch-, Gelpermeations- und Niederdruckflüssigkeits-Chromatographie) angereichert und über die semipräparative RP-HPLC gereinigt. Zur Identifizierung und Strukturaufklärung der Reinsubstanzen gelangten FAB-MS, IR, optische Drehung sowie  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Techniken zum Einsatz.

Fünf Aminosäure-Derivate und vier  $\gamma$ -Glutamylpeptide konnten aus Knoblauch rein dargestellt werden. Bei (-)-N-(1'-Deoxy-1'-D-fructopyranosyl)-S-allyl-L-cysteinsulfoxid handelt es sich um eine neue Substanz, die der bei höheren Pflanzen seltenen Klasse der Aminosäureglykoside angehört. (+)-S-Methyl-L-cysteinsulfoxid, (+)-S-(trans-1-Propenyl)-L-cysteinsulfoxid und  $\gamma$ -L-Glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cystein konnten bis anhin noch nie aus Knoblauch isoliert werden.  $\gamma$ -L-Glutamyl-S-allyl-L-cystein,  $\gamma$ -L-Glutamyl-S-allylthio-L-cystein und  $\gamma$ -L-Glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cystein wurden erstmals mittels NMR-Experimenten untersucht. Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Werte aller isolierten Verbindungen erfolgte erstmalig vollständig und eindeutig mit Hilfe von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HETCOR-Experimenten.

Im analytischen Teil wurde zuerst das Aminosäuremuster (Fingerprintanalyse) von Knoblauch- und Bärlauchblättern und -zehen miteinander verglichen, indem nach Vorsäulenderivatisierung und anschließender HPLC-Analyse 12 S-Alk(en)yl-L-cysteinderivate und 16 ubiquitäre Aminosäuren als Isoindolderivate in einem einzigen chromatographischen Run getrennt wurden. Die Identifizierung

gelang durch in-Serie-Schaltung von Fluoreszenz- und elektrochemischer Detektion und Vergleich der Retentionszeiten und der Detektorsignalverhältnisse mit Referenzsubstanzen.

Zwei weitere HPLC-Methoden ermöglichten die qualitative und quantitative Bestimmung von S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxiden einerseits und  $\gamma$ -L-Glutamylpeptiden andererseits in Knoblauchblättern, -zehen und -extrakten. Sie können für die Standardisierung und Qualitätskontrolle von Knoblauchzubereitungen eingesetzt werden.

Alliin, die genuine Hauptkomponente im Knoblauch, gilt als Vorläufer der pharmakologisch aktiven Umsetzungsprodukte. In verschiedenen biologischen Testsystemen konnte ihr selbst keine Aktivität nachgewiesen werden. In orientierenden Untersuchungen zeigten  $\gamma$ -L-Glutamyl-S-allyl-L-cystein und  $\gamma$ -L-Glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cystein eine leichte Hemmung der durch Adrenalin induzierten Thrombozytenaggregation. (-)-N-(1'-Deoxy-1'-D-fructopyranosyl)-S-allyl-L-cysteinsulfoxid hemmte signifikant die durch ADP und Adrenalin ausgelöste Thrombozytenaggregation.

## S U M M A R Y

This work describes aspects of the isolation, structure elucidation, analytical determination and biological activity of genuine polar constituents of *Allium sativum* L. All of the amino acids were isolated for the first time from garlic leaves. (-)-N-(1'-deoxy-1'-D-fructopyranosyl)-S-allyl-L-cysteine sulphoxide, a new unusual amino acid glycoside, shows a significant inhibition of platelet aggregation. With two HPLC methods the cysteine derivatives and several ubiquitous amino acids could be separated and analyzed qualitatively and quantitatively, whereas  $\gamma$ -glutamyl peptides were quantified by developing a further HPLC method.

To inactivate enzymes in general the extraction of the freeze dried plant material was performed with a high amount of methanol (80%) in the extraction medium. Lipophilic compounds were removed by extraction with dichloromethane while the amino acids and peptides were concentrated using chromatographic methods (ion exchange, gelpermeation and low pressure liquid chromatography) and purified by semipreparative reversed phase HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Five amino acid derivatives and four  $\gamma$ -glutamyl peptides were isolated from garlic and their structures elucidated by means of one and two dimensional NMR spectroscopy, FAB-MS and IR spectroscopy. (-)-N-(1'-deoxy-1'-D-fructopyranosyl)-S-allyl-L-cysteine sulphoxide is a new unusual amino acid glycoside. (+)-S-methyl-L-cysteine sulphoxide, (+)-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine sulphoxide and  $\gamma$ -L-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine too have not yet been isolated from *Allium sativum* L. NMR experiments of  $\gamma$ -L-glutamyl-S-allyl-L-cysteine,  $\gamma$ -L-glutamyl-S-allylthio-L-cysteine and  $\gamma$ -L-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine were reported for the first time. The  $^{13}\text{C}$ -NMR data of all pure compounds were unambiguously assigned by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HETCOR experiments. The significance of the isolated substances was examined on performing analytical analysis and biological testing.

The first analytical method was developed to compare qualitatively and quantitatively the amino acid pattern of garlic and wild garlic leaves and cloves. After pre-column derivatization and subsequent HPLC analysis 12 S-alk(en)yl-L-cysteine derivatives and 16 ubiquitous amino acids were separated as isoindoles in a single chromatographic run. The identification of the plant constituents was performed by comparing their retention times and their ratio of two detectors signals (fluorescence and electrochemical) with the ones of reference substances. The S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides first and the  $\gamma$ -L-glutamyl peptides later on were qualitatively and quantitatively determined in garlic leaf, clove and extract samples developing two further HPLC methods.

Various in vitro tests made it evident that alliin, the precursor of the pharmacologically active transformation products of garlic, has no biological activity itself. The first experiments, dealing with the platelet-function inhibiting effect, indicated a slight activity of  $\gamma$ -L-glutamyl-S-allyl-L-cysteine and  $\gamma$ -L-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine as far as adrenaline induced aggregation was concerned. But (-)-N-(1'-deoxy-1'-D-fructopyranosyl)-S-allyl-L-cysteine sulphoxide revealed a significant inhibition of platelet aggregation, induced by ADP and adrenaline.