

Hans Achenbach, Wolfgang Karl und Sheila Smith

Inhaltsstoffe des Rauschpfeffers, IV¹⁾

Zur gaschromatographischen Trennung der Kawa-Lactone — (+)-5.6.7.8-Tetrahydro-yangonin, ein neues Kawa-Lacton aus Rauschpfeffer

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

(Eingegangen am 24. Mai 1971)

Es wurden Bedingungen für die gaschromatographische Analyse von Kawa-Lactonen ausgearbeitet. Aus Fraktionen der Säulenchromatographie von Rauschpfeffer-Extrakten konnte durch präparative GC ein neues Kawa-Lacton isoliert werden, dem die Struktur des (+)-5.6.7.8-Tetrahydro-yangonins (I) zukommt.

Constituents of *Piper methysticum* Forst., IV¹⁾

Gaschromatographic Separation of Kawa-Lactones — (+)-5.6.7.8-Tetrahydroyangonin, a New Kawa-Lactone from *Piper methysticum* Forst.

Conditions have been elaborated for the gaschromatographic analysis of kawa-lactones. From fractions of the column chromatography of kawa-extracts a new lactone was isolated by GC, which could be shown to be (+)-5.6.7.8-tetrahydroyangonin (I).

Da sich mit der Analyse von Kawa-Lactonen im Rauschpfeffer in jüngerer Zeit verschiedene Arbeitskreise beschäftigten²⁻⁵⁾, soll hier über die gaschromatographische Trennung dieser Substanzen berichtet werden.

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war die Beobachtung, daß in den Massenspektren bestimmter Fraktionen der Säulenchromatographie von Rauschpfeffer-Extrakten¹⁾ regelmäßig auch Ionen auftraten, die mit den bisher in der Natur bekannten Kawa-Lactonen (Tab. 1) nicht erklärt werden konnten. Die Auswertung der Massenspektren deutete auf eine Verbindung vom Dihydrokawain-Typ mit dem Molekulargewicht 262.

Die Schwierigkeiten einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung und Reinigung von Kawa-Lactonen sind bekannt^{2,3,6)}: Die R_F -Werte unterscheiden sich nur geringfügig; kleine Substanzmengen lassen sich nur schwer nachweisen.

¹⁾ III. Mitteil.: H. Achenbach und W. Karl, Chem. Ber. 104, 1468 (1971).

²⁾ R. L. Young, J. W. Hylin, D. L. Plucknett, Y. Kawano und R. T. Nakayama, Phytochemistry 5, 795 (1966).

³⁾ P. Jössgang und D. Molho, J. Chromatogr. [Amsterdam] 31, 375 (1967).

⁴⁾ L. Csupor, Arch. Pharmaz. 303, 193 (1970).

⁵⁾ L. Csupor, Pharmazie 25, 197 (1970).

⁶⁾ R. Hänsel und H. Rimpler, Z. analyt. Chem. 207, 270 (1965).

Tab. 1. Aus Rauschpfeffer isolierte Kawa-Lactone

<i>Yangonin-Typ</i>	<i>Kawain-Typ</i>	<i>Dihydrokawain-Typ</i>
Demethoxyyangonin (R = R' = H)	Kawain (R = R' = H)	Dihydrokawain (R = R' = R'' = H)
Yangonin (R = OCH ₃ ; R' = H)	Methysticin (R, R' = OCH ₂ O)	Dihydromethysticin (R, R' = OCH ₂ O; R'' = H)
11-Methoxy-yangonin (R = R' = OCH ₃)		Dihydrokawainol (R = R' = H; R'' = OH)

Durch zweidimensionale Technik²⁾ und Mehrfachentwicklung^{3,6)} wurden zwar bessere Trennergebnisse erzielt, die sich jedoch auf präparative Problemstellungen nicht gut übertragen lassen.

Der Versuch schien wenig sinnvoll, auf diesem Wege eine weitere homologe Verbindung in geringer Konzentration erkennen und isolieren zu wollen. Deshalb haben wir erstmals eine gaschromatographische Analyse von Kawa-Lactonen versucht und zunächst an Gemischen reiner bekannter Verbindungen Vorversuche durchgeführt. Dabei waren wir uns bewußt, im wesentlichen mit dem Problem konfrontiert zu sein, durch die Wahl geeigneter GC-Bedingungen pyrolytische Prozesse zu unterdrücken. Unter diesem Aspekt verwendeten wir Glassäulen (1/4" im Hinblick auf eine präparative Anwendbarkeit) und benutzten silanisiertes Chromosorb als Trägermaterial. Die Säulenfüllung wurde durch sehr kleine Stopfen silanisierter Glaswolle fixiert, da wir feststellen mußten, daß Glaswolle die Pyrolyse von Kawa-Lactonen katalysieren kann.

Um die Trennung weiter zu verbessern, haben wir das Totvolumen zwischen Einspritzblock und Säule durch Einbringen eines Glasstabes verringert.

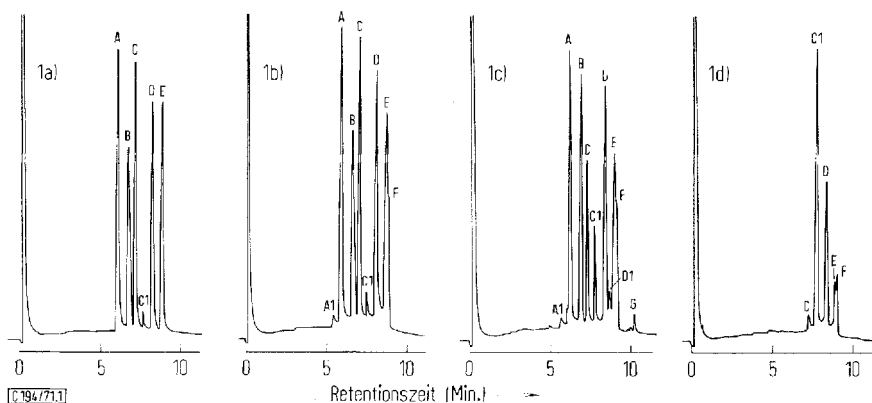
Mit dieser Anordnung erhielten wir die in Abbild. 1 wiedergegebenen Gaschromatogramme.

Abbild. 1a) zeigt das Chromatogramm des Testgemisches. Die eingesetzten 5 Kawa-Lactone wurden in Anlehnung an bekannte Vorschriften⁷⁾ aus Rauschpfeffer isoliert. Man erkennt bei (C1) eine Nebenkomponente, die in Kawain und Dihydromethysticin noch enthalten war, obwohl diese Substanzen durch wiederholte Kristallisation gereinigt worden sind.

Alle Komponenten lassen sich am Ausgang des Gaschromatographen zurückgewinnen: Weder gaschromatographisch noch massenspektrometrisch waren nennenswerte pyrolytische Zersetzungsprodukte nachzuweisen.

Methysticin (Abbild. 1b) hat eine ähnliche Retentionszeit wie Yangonin, von dem es sich nur durch eine Schulter absetzt. Außerdem tritt hier eine partielle Zersetzung

⁷⁾ R. Hänsel und H. U. Beiersdorff, *Arzneimittel-Forsch.* **9**, 581 (1959).



Abbild. 1. Gaschromatogramme von Kawa-Lactonen.

Injiziert wurden Lösungen von:

1a)	1b)	1c)	1d)
Dihydrokawain (A)	wie 1a	Äthylchlorid-	Fractionen B76--81
Kawain (B)	+ Methysticin (F)	Extrakt aus	der Säulenchromato-
Demethoxyyangonin (C)		Rauschpfeffer	graphie von Rausch-
Dihydromethysticin (D)			pfeffer-Extrakt
Yangonin (E)			

auf, wie sich am Anstieg der Nulllinie erkennen läßt. Den sehr schwachen Peak (A1) führen wir auf eine Verbindung zurück, die durch Spontanzerersetzung von Methysticin im Bereich des Einspritzblocks entsteht.

Gaschromatogramm 1c) erhielten wir bei der Injektion einer Lösung, die ohne weitere Reinigungsoperationen durch Soxhlet-Extraktion aus Rauschpfeffer gewonnen wurde. Wie das Resultat zeigt, eignet sich die Gaschromatographie hervorragend zur Schnellanalyse der Inhaltsstoffe des Rauschpfeffers. Eine entsprechende Versuchsanordnung und der Vergleich mit Testgemischen sollten auch eine quantitative Bestimmung ermöglichen.

Im Gaschromatogramm 1c) treten drei relativ schwache Peaks auf ((C1), (D1), (G)), die sich mit den bekannten Kawa-Lactonen nicht korrelieren lassen. Durch GC-Vergleich mit 11-Methoxy-yangonin⁸⁾ (Retentionszeit: 9.8 Min.) konnte für (G) die Identität mit diesem Lacton ausgeschlossen werden.

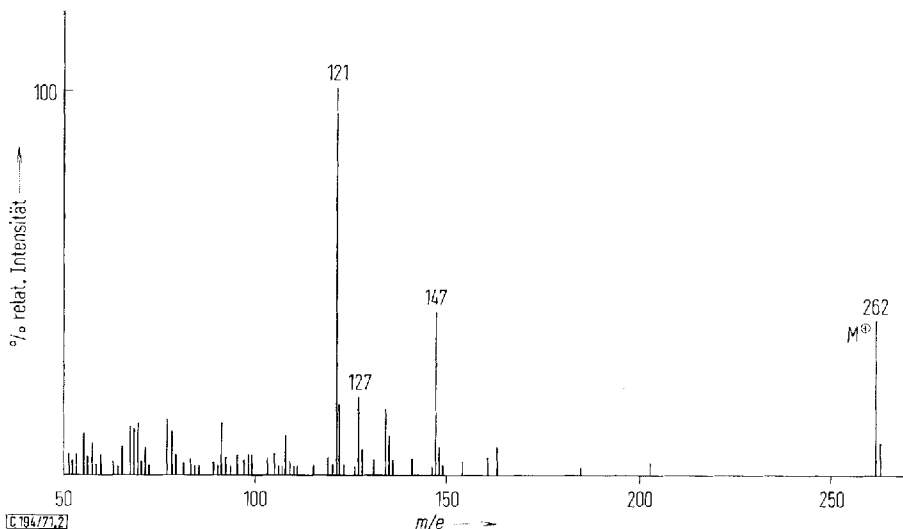
Die Fraktionen (D1) und (G) wurden nicht weiter untersucht.

Substanz C1 fanden wir als Hauptkomponente in einer speziellen Fraktion der Säulenchromatographie von Rauschpfeffer-Extrakten (Abbild. 1d). Hieraus läßt sich C1 durch präparative GC abtrennen; auch wiederholte Kristallisation führt zu einem Präparat, das lediglich noch sehr wenig Dihydromethysticin enthält.

⁸⁾ R. Hänsel und L. Klaproth, Arch. Pharmaz. **299**, 503 (1966).

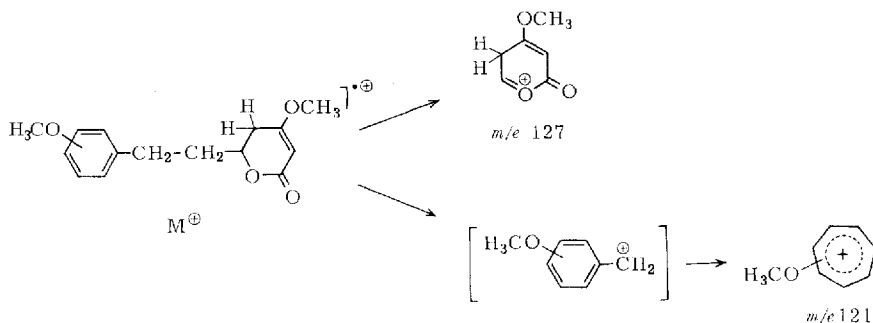
(+)-5.6.7.8-Tetrahydro-yangonin

C1 — Schmp. 89—90°; $[\alpha]_D^{20}$: +20° (CHCl₃) — zeigt im Massenspektrum (Abbild. 2) das Molgewicht 262 und ein Fragmentierungsverhalten, wie es für Kawa-Lactone vom Dihydrokawain-Typ charakteristisch ist^{9,10}.



Abbild. 2. Massenspektrum der GC-Fractionen (C1)

Das Fragment bei m/e 127 ist dem Lactonring zuzuordnen, während das Auftreten des Basis-Peaks bei m/e 121 für eine methoxylsubstituierte Benzyl-Gruppierung spricht.



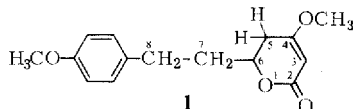
Hiermit in Übereinstimmung sind die Ergebnisse von MS-Messungen bei Hochauflösung: Man findet für das Molekül-Ion die Zusammensetzung C₁₅H₁₈O₄ und für den Basis-Peak C₈H₉O.

⁹) M. Pailer, G. Schaden und R. Hänsel, Mh. Chem. **96**, 1842 (1965).

¹⁰) H. Achenbach und G. Wittmann, Tetrahedron Letters [London] **1970**, 3259.

Die *p*-Anordnung des Methoxyl-Substituenten am Benzolring kann aus dem NMR-Spektrum abgeleitet werden: Die aromatischen Protonen erscheinen als A_2B_2 -System ($\tau = 2.83$ (d) und 3.19 (d); $J = 8.5$ Hz).

Daraus ergibt sich für Cl die Struktur des 5.6.7.8-Tetrahydro-yangonins (1).



Der MS- und GC-Vergleich mit synthetischem (\pm)-5.6.7.8-Tetrahydro-yangonin¹¹⁾ bestätigte die Identität.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Die Massenspektren wurden mit einem CH4-Massenspektrometer der Firma Varian-MAT aufgenommen. Ionenquelle TO4; Ionisierungsenergie 70 eV; Einlaßsystem: direkt (Ofeneinsatz). Die elementare Zusammensetzung von Ionen wurde ermittelt durch „Peak-matching“ mit einem hochauflösenden Massenspektrometer SM1-B der Firma Varian-MAT bei einer Auflösung von $M/\Delta M = 12000$.

Die Registrierung der IR-Spektren erfolgte an KBr-Preßlingen mit einem IR-Spektralphotometer Perkin-Elmer 157. UV-Spektren wurden aufgenommen in Methanol p.a. mit einem Spektralphotometer DMR 21 der Firma Carl Zeiss.

Die 1H -NMR-Spektren erhielten wir mit einem Varian-Kernresonanzspektrometer A-60A; Lösungsmittel: Deuteriochloroform; innerer Standard: Tetramethylsilan.

Zur Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Kieselgel H (Fa. Merck), Schichtdicke 0.25 mm. Sichtbarmachung der Substanzen erfolgte mit Joddampf.

Für die Gaschromatographie stand ein Gaschromatograph der Baureihe 5750 (Firma Hewlett und Packard) zur Verfügung; Detektor: WLD.

Herkunft der Kawa-Lactone: Rhizoma Kawa-Kawa, Erg. B. 6 (bezogen von Fa. Caesar und Loretz, 4010 Hilden), wurde mit Äther im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Aus dem Ätherextrakt wurden in Anlehnung an bekannte Vorschriften⁷⁾ durch fraktionierte Kristallisation und durch Säulenchromatographie die Kawa-Lactone isoliert. Reinigung erfolgte durch mehrfaches Umkristallisieren.

Äthylenchlorid-Extraktion der Kawa-Droge: 1 g Rhizoma Kawa-Kawa (s. o.) wurde fein gepulvert und mit 40 ccm Äthylenchlorid im Soxhlet extrahiert (95° Badtemp.; 2 Stdn.). Dieser Extrakt wurde i. Vak. eingeeengt (Trockenrückstand 82 mg) und zur Gaschromatographie in Chloroform gelöst.

Gaschromatographie: Wir benutzten 2-m-Säulen (Glas, 6 mm Außendurchmesser, ca. 3.5 mm Innendurchmesser) gefüllt mit Silikongummi SE 30 2proz. auf Chromosorb W 60/80 AW/DMCS unter Verwendung minimaler Mengen silanisierter Glaswolle zur Fixierung der Säulenfüllung. Trägergas: Helium; Durchflußgeschwindigkeit: 145 ccm/Min. Temperaturprogrammierung: 130–300° mit 15°/Min.; WLD: 300°; Einspritzblock: 210°. Pro Injektion wurden 4–6 μ l einer 10proz. Lösung der Substanzmischungen in Chloroform aufgegeben.

¹¹⁾ F. Werny und R. Hänsel, Naturwissenschaften **50**, 355 (1963).

Wir fanden folgende Durchbruchtemperaturen:

Dihydrokawain	221°
Kawain	231°
Demethoxyyangonin	237°
Tetrahydroyangonin (1)	243°
Dihydromethysticin	253°
Yangonin	262°
Methysticin	263°
11-Methoxy-yangonin	276°

Zur präparativen GC wurden die entsprechenden Fraktionen am Ausgang des Gerätes in Kühlfallen mit flüssigem Stickstoff ausgefroren. Bei Anwesenheit von Methysticin im Analysengemisch wurde die präparative GC-Reinigung wiederholt.

Aufarbeitung des Pflanzenmaterials: 650 g Rhizoma Kawa-Kawa, Erg. B. 6, wurden pulverisiert und im Soxhlet mit Äther erschöpfend extrahiert. Die Droge wurde anschließend wiederholt mit jeweils 1 l Methanol mazeriert, dieser Auszug eingeeengt, der sirupöse Rückstand (ca. 11 g) in Chloroform suspendiert und an 150 g Kieselgel (<100 mesh, Fa. Mallinckrodt) chromatographiert¹²⁾.

Wir eluierten mit Chloroform und erhielten 75 Fraktionen A (jeweils 30 ccm), die wir auf DC-Platten untersuchten (Laufmittel: Benzol/Essigester/Methanol, 60 : 35 : 2 v/v/v). Entsprechende Fraktionen wurden vereinigt und durch Behandlung mit 5proz. Natriumhydrogencarbonatlösung von sauren Bestandteilen befreit.

Die Fraktionen A28–A44 (Trockenrückstand 0,9 g) chromatographierten wir erneut an 25 g Kieselgel (s.o.). Benzol/Methanol (1%) als Elutionsmittel ergab 125 Fraktionen B (jeweils 15 ccm).

Aus den vereinigten Fraktionen B76–B81 (ca. 150 mg) schieden sich aus wenig Methanol Kristalle ab (44 mg), die vorwiegend aus *Tetrahydroyangonin* (1) bestanden (MS, GC). Weiteres Material fiel aus der Mutterlauge an.

(+)-5.6.7.8-Tetrahydro-yangonin (1): Durch wiederholtes Umkristallisieren aus Äther erhielten wir farblose Nadeln (ca. 2 mg) vom Schmp. 89–90°. $[\alpha]_D^{20}$: +20° ($c = 0.08$ in CHCl_3).

IR: ν_{CO} 1710/cm.

UV (nach nochmaliger GC-Reinigung): λ_{max} 226 nm ($\lg \epsilon = 4.30$), 277 (3.33) und 283 (3.26); λ_{min} 266 (3.24).

MS-Messungen bei Hochauflösung

nominale Masse	exakte Masse		Zusammensetzung
	Gef.	Ber.	
262 (M ⁺)	262.1207	262.1205	C ₁₅ H ₁₈ O ₄
147	147.0807	147.0809	C ₁₀ H ₁₁ O
127	127.0390	127.0395	C ₆ H ₇ O ₃
121	121.0652	121.0653	C ₈ H ₉ O

(±)-5.6.7.8-Tetrahydro-yangonin: *Yangonin* (130 mg) wurde in 7 ccm Eisessig an Pd (5% auf Al₂O₃; Fa. Fluka) bei Raumtemp. 40 Min. hydriert. Nach Zugabe von Wasser fiel im Kühlschrank ein farbloser Niederschlag an, der aus Äthanol/Wasser umkristallisiert wurde. Farblose Nadeln vom Schmp. 98–101° (Lit.¹¹⁾; 98,5–99°). Ausb. 35 mg (26%).

¹²⁾ H. Achenbach und W. Karl, Chem. Ber. **103**, 2535 (1970).