

DIE VERTEILUNG VON INHALTSSTOFFEN IN DREI PIMPINELLA-ARTEN

EGON STAHL und DAGMAR HERTING

Pharmakognosie und Analytische Phytochemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, BRD

(Eingegangen 20 November 1975)

Key Word Index—*Pimpinella major*; *P. saxifraga*; *P. peregrina*; Apiaceae; epoxy ester; 4-(1',2'-epoxypropyl)-phenyl tiglic ester; isoeugenol epoxy tiglic ester; isoeugenol epoxy-2-methyl butanoic ester; benzofurane; bisabolangelone; 2-methyl-5-methoxybenzofurane; sesquiterpenes.

Abstract—The roots of *Pimpinella major* Huds., *P. saxifraga* L. and *P. peregrina* L. do not contain any of the furocoumarins, indicated in previous literature. The main components of roots and fruits of *P. major* and *P. saxifraga* are isoeugenol epoxy tiglic ester, isoeugenol epoxy-2-methyl butanoic ester and 4-(1',2'-epoxypropyl)-phenyl tiglic ester. The fruit and roots of *P. peregrina* do not contain these components. Only the fruit of *P. major* contains β -bisabolene and larger amounts of bisabolangelone.

In den Wurzeln von *Pimpinella major* Huds. und *P. saxifraga* L. (Apiaceae) sollen neben Polyacetylenen [1] als Hauptinhaltsstoffe die Furocoumarine Pimpinellin, Isopimpinellin, Bergapten, Isobergapten und Sphondin vorkommen [2–7]. Aus den Wurzeln von *P. saxifraga* L. wurde der Isoeugenolepoxidester der 2-Methylbuttersäure [8] und die 2-Methylpropionate von Isoeugenol und Isoeugenolepoxid isoliert [9].

Offen steht die Frage, ob eine chemische Unterscheidung der Wurzeln der Kleinen und Großen Bibernelle (*P. saxifraga* und *P. major*) möglich ist. Ferner ist über die Inhaltsstoffe der als Verfälschung vorkommenden Wurzeln von *P. peregrina* L. und über die Früchte der genannten drei Pimpinella-Arten bisher nichts bekannt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Authentische Wurzeln von *P. major*, *P. saxifraga* und *P. peregrina* wurden mittels des Multi-TAS-Verfahrens [10–11] auf die Anwesenheit von Furocoumarinen geprüft. Sowohl diese Untersuchungen als auch die Lösungsmittelextraktion mit anschließender DC ergab, daß in den drei genannten Arten keine Furocoumarine enthalten sind. Da in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen [12,13] in den Handelsdrogen mehr oder weniger große Mengen Furocoumarine gefunden wurden und diese ausschließlich auf eine Verfälschung mit Heracleum-Wurzel zurückgehen, erklären sich die früheren, falschen Literaturangaben.

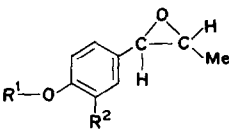
Aus den Wurzeln von *P. major* α *vulgaris* (Normalform) konnte erstmalig als Hauptinhaltsstoff der Isoeugenolepoxidester der Tiglinsäure isoliert werden. Die Wurzeln der Form *P. major* α *vulgaris* f. *trisecta* enthalten dagegen sowohl den Isoeugenolepoxidester der Tiglinsäure als auch den der 2-Methylbuttersäure als Hauptbestandteile. In den Wurzeln von *P. saxifraga* konnte das Vorkommen des Isoeugenolepoxidesters der 2-Methylbuttersäure [8] bestätigt werden. Als neuer Inhaltsstoff wurde der in geringer Menge darin vorkommende Isoeugenolepoxidester der Tiglinsäure nachgewiesen. Die Wurzeln der Form *trisecta* von *P. major* stehen also im

Hinblick auf ihre Inhaltsstoffe zwischen der Normalform und der *P. saxifraga*.

Die Tab. 1 ergibt die Verteilung der Epoxidester in den Wurzeln und den Früchten. Man ersieht hieraus, daß nur quantitative Unterschiede bestehen und somit eine Unterscheidung auf chemischem Wege schlecht möglich ist. Die Wurzeln von *P. peregrina* L. lassen sich dagegen leicht abgrenzen, da diese die oben genannten Epoxidester nicht enthalten.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Früchten: Während sich aufgrund der Behaarung die Früchte von *P. peregrina* leicht von denen der *P. major* und *P. saxifraga* abtrennen lassen, bietet die morphologische Unterscheidung der beiden letzteren erhebliche Schwierigkeiten. Die chemische Untersuchung ergab nun, daß sowohl in der Normalform als auch in der Form *trisecta*

Tabelle 1. Verteilung der Epoxid-Ester in der Wurzel und in den Früchten von *Pimpinella*

		R ¹ Tiglinoyl- R ² -OMe	R ¹ 2-Methyl-buteryl- R ² -OMe	R ¹ Tiglinoyl- R ² -H
Wurzel				
<i>P. major</i> (Normalform)		+++	—	(+)
<i>P. major</i> (f. <i>trisecta</i>)		+++	++	—
<i>P. saxifraga</i>		(+)	++++	—
Früchte				
<i>P. major</i> (Normalform)		—	—	++++
<i>P. major</i> (f. <i>trisecta</i>)		+++	++	—
<i>P. saxifraga</i>		+	++++	—

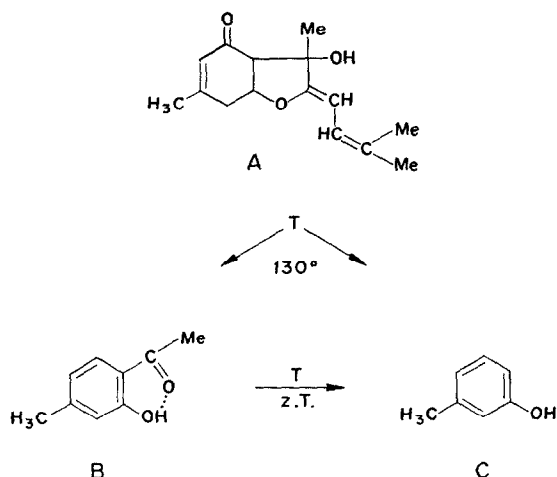


Abbildung 1. Fragmentierungsschema von Bisabolangelone unter TAS-Bedingungen. (A) Bisabolangelone; (B) 2-Hydroxy-4-methylacetophenon; (C) *m*-Kresol.

von *P. major* als Hauptinhaltsstoff ein 3,3a,7,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2-(3-methyl-2-butenyliden)-4-benzofuranon in erheblichen Mengen vorkommt. Diese Verbindung konnte zuerst von Novotny und Mitarbeitern [15] aus den Früchten von *Angelica silvestris* L. isoliert und strukturell aufgeklärt werden. Ihr wurde die Bezeichnung Bisabolangelone gegeben. Später hat man die gleiche Verbindung aus den Wurzeln von *Angelica koréana* Max. isoliert und irrtümlicherweise mit dem Namen Angelikoreanol belegt [14].

Bei dem Bisabolangelone (Fig. 1, A) handelt es sich um eine thermolabile, weiße, kristalline Verbindung. Wir fanden, daß sie unter den TAS-Bedingungen bereits ab 130°C thermolysiert (Fig. 1). Als Fragmentierungsprodukte wurden 2-Hydroxy-4-methylacetophenon (B) und *m*-Kresol (C) nachgewiesen. Aufgrund dieser Thermolyseprodukte ist die Erkennung von *P. major* einfach möglich, zumal das Bisabolangelone in *P. saxifraga* und in *P. peregrina* fehlt.

Als weitere Hauptinhaltsstoffe der Früchte von *P. major* und *P. saxifraga* wurden die bereits in den Wurzeln nachgewiesenen Epoxidester festgestellt. Während die Früchte von *P. major* Normalform und von *P. major* f. *trisecta* beide Bisabolangelone enthalten, unterscheiden sie sich deutlich in der Fraktion der Epoxidester. In den Früchten der Normalform konnte ein 4-(1',2'-epoxypropyl)phenyl-Tiglin säureester nachgewiesen werden. Die Früchte der Form *trisecta* zeigen dagegen die gleiche Zusammensetzung wie die Ester in der Wurzel: sie enthalten den Isoeugenolepoxidester der Tiglin säure und in geringen Mengen den entsprechenden 2-Methylbuttersäureester.

In den Früchten von *P. saxifraga* besteht die Epoxid-Ester-Fraktion, ebenfalls wie bei der Wurzel, hauptsächlich aus dem Isoeugenolepoxidester der 2-Methylbuttersäure (Einzelheiten s. Tab. 1).

Sowohl die Früchte von *P. major* beider Formen als auch die von *P. saxifraga* enthalten eine Reihe von Sesquiterpenen. Im ätherischen Öl beider Formen von *P. major* konnte bis zu 70% β -Bisabolen nachgewiesen werden.

In den Früchten von *P. peregrina* kommt—wie bereits erwähnt—kein Bisabolangelone und keine der genannten Epoxidester vor. Neben den von Kubeczka [9] bereits

beschriebenen Hauptinhaltsstoffen des ätherischen Öls, nämlich α -Bergamoten, konnten wir geringe Mengen an β -Bisabolen und 2-Methyl-5-methoxybenzofuran nachweisen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die DC-Trennungen erfolgten auf Kieselgel GF₂₅₄ Schichten. Zur Trennung der Furocumarinderivate wurde als Fließmittel Äther-Benzol (1:1) mit 10% HoAc gesättigt verwendet. KS, 2 \times 15 cm. Die Detektion der einzelnen Zonen erfolgte durch Betrachten der Schicht im langwelligen UV-Licht (366 nm) und durch Besprühen mit 0,5proz. wäßriger KJ-J₂-Lösung. Sphondin *hR_f* 53–57 (blau-grüne Zone); Isopimpinellin *hR_f* 59–63 (violette Zone); Bergapten *hR_f* 63–66 (rötlich-violette Zone); Pimpinellin *hR_f* 67–72 (violette Zone); Isobergapten *hR_f* 72–77 (hellblaue Zone).

Zur Trennung der Inhaltsstoffe der Früchte wurde CHCl₃-EtOAc (97 + 3) eingesetzt, KS, 1 \times 10 cm. Detektiert wurden die Zonen mit Anisaldehyd-H₂SO₄-Reagenz [16]. *m*-Kresol *hR_f* 42–46 (rote Zone). Bisabolangelone *hR_f* 25–30 (blaue Zone). 4-(1',2'-epoxypropyl)-phenyl-Tiglin säureester *hR_f* 76–80 (grüne Zone). Isoeugenolepoxidester der Tiglin säure und der 2-Methylbuttersäure *hR_f* 76–80 (violette Zone). β -Bisabolen, u.a. *hR_f* 95–100 (violette Zone). Die Aufgabe der Verbindungen und die Mikrothermoextraktion der Drogen erfolgte mit dem TAS-Ofen bzw. Multi-TAS-Ofen nach Stahl [10,11,17] bei einer Temperatur von 250 und einer Thermolyse-dauer von 3 min.

Isolierung der Verbindungen. 200 g getrocknete und gepulverte Wurzel bzw. Fruchtrohde wurden erschöpfend mit Ät₂O extrahiert. Der vom Äther befreite Wurzelextrakt wurde durch SLC auf einer Kieselgelsäule (Kieselgel 60, 0,05–0,2 mm, Länge 1,5 m, \varnothing 2 cm) mit 1 l CH₂Cl₂-MeOH (19:1) aufgetrennt. Die ersten 6 Fraktionen zu je 100 ml enthalten Begleitsubstanzen. Die Fraktionen 6–10 liefern nach einer weiteren SLC auf einer mit 3% AgNO₃ imprägnierten Kieselgelsäule den Isoeugenolepoxidester der Tiglin säure bzw. der 2-Methylbuttersäure. Die Trennung und der Nachweis der beiden Verbindungen in der Wurzel von *P. major* α *vulgaris* f. *trisecta* erfolgte durch GC-MS-Kopplung. Die Analysen wurden an einem Gaschromatographen Varian 2860/3 mit FID durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine 3% SE 30 auf Chromosorb W AW-DMCS 80/100 Edelstahlsäule 1,8 m/1/8" verwendet. Strömungsgeschwindigkeit: 15 ml/min. Ofentemperatur und Temperaturprogramm 150°–220° in 8°/min. Detektorofen: 240°, synthetische Luft 300 ml/min, hochreiner Wasserstoff 30 ml/min. Der vom Äther befreite Extrakt der Früchte von *P. major* (Normalform und f. *trisecta*) wurde auf einer Kieselgelsäule (60, 0,05–0,2 mm, Länge 30 cm, \varnothing 2 cm) mit 200 ml Petrol-CH₂Cl₂ (1:1) und danach mit 800 ml CH₂Cl₂ vorfraktioniert. Fraktionen zu je 100 ml wurden aufgefangen. Fraktion I enthält die Kohlenwasserstoffe (β -Bisabolen). Fraktion II–V die verschiedenen Epoxid-Ester, Fraktion V–IX Bisabolangelone. Das β -Bisabolen der Fraktion I wurde auf einer mit 3% AgNO₃ imprägnierten Kieselgelsäule mit 500 ml Petrol EtOAc (19:1) als Elutionsmittel abgetrennt. Zur Reinigung der Fraktion der Epoxid-Ester wurde eine mehrfache SLC über Kieselgelsäulen (60, 0,05–0,2 mm, Länge 1,5 m \varnothing 2 cm) mit 500 ml Petrol-CH₂Cl₂ (7:3), 1000 ml Petrol-CHCl₃ (3:7) und 2000 ml CH₂Cl₂ durchgeführt. Fraktionen zu je 100 ml. Aus Fraktion 16–33 konnten die Verbindungen gewonnen werden. Der 4-(1',2'-epoxypropyl)-phenyl-Tiglin säureester aus *P. major* (Normalform) konnte so rein gewonnen werden. Die beiden Epoxid-Ester aus den Früchten der Form *trisecta* wurden unter den bei der Wurzel bereits angegebenen Bedingungen durch GC weiter aufgetrennt. Zur Gewinnung des Bisabolangelone wurden die entsprechenden Fraktionen der SLC-Trennung am Rotationsverdampfer im Vakuum bis fast zur Trockene eingedunstet. Durch Zugabe von wenigen ml Petrol konnte Bisabolangelone als kristalline Verbindung ausgefällt werden. Die Reinigung erfolgte durch mehrmaliges Lösen in CH₂Cl₂ und erneutes Ausfällen mit Petrol. Die Isolierung des α -Bergamotens,

β -Bisabolens und 2-Methyl-5-methoxybenzofurans aus den Früchten von *P. peregrina* erfolgte aus dem ätherischen Öl. Zur Gewinnung dieses Öles wurden 100 g getrocknete, zerkleinerte Droge 6 Stunden in der Karlsruher Apparatur destilliert. Die Auftrennung des ätherischen Öles erfolgte auf einer Al_2O_3 -säule (neutral, Akt. II-III, Länge 1,5 m, \varnothing 2 cm) mit Petrol und Petrol- CH_2Cl_2 steigender Polarität. Die Sesquiterpenfraktion mit α -Bergamoten und β -Bisabolen wurde auf einer mit 3% AgNO_3 imprägnierten Kieselgelsäule aufgetrennt. Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit einem Varian A 60 (60 MHz) in CDCl_3 als Lösungsmittel und Tetramethylsilan als inneren Standard aufgenommen. Bisabolangelone wurde im KBr-Preßling vermessen, die flüssigen Verbindungen als Film zwischen NaCl-Fenstern. Die UV-Spektren wurden in CH_2Cl_2 als Lösungsmittel gemessen. Der Schmelzpunkt ist unkorrigiert.

3,3a,7,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2-(3-methyl-2-butenyliden)-4-benzofuranon; Bisabolangelone. $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$, $F_p = 142-145^\circ$ (Lit. [15] $145-148^\circ$, Lit. [14] $157-158^\circ$) $[\alpha]_D^{20} = +129^\circ$ ($c = 1,5$ in CHCl_3) (Lit. [15] $+132^\circ$). Die Banden des ^1H -NMR-, IR- und UV-Spektrums stimmen mit denen der Literatur überein [14,15].

Isoeugenolepoxid-2-Methylbuttersäureester. $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$. Das ^1H -NMR-Spektrum und Massenspektrum stimmen mit dem der Lit. [8] überein.

Isoeugenolepoxid-Tiglinensäureester. $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$, $[\eta]_D^{20} = 1,5241$; MS M^+ 262 (28%), m/e 163 (35%), 162 (63%), 83 (100%), 55 (95%); $\nu_{\text{max}}(\text{Film})$: 1730 cm^{-1} (CO-stretching) $\delta_{60\text{ MHz}}^{\text{CDCl}_3}$: CH-3' 1,45 (d, 3 P), SH-2' 3,03 (d + q, 1 P), CH-1' 3,60 (d, 1 P), CH-3, 5, 6 7, 23 (m, 3P), OMe 3,8 (s, 3P), Tiglinoylrest: CH-3 7,03 (d, 1P), CH-4 1, 90 (d, 3P), CH-1' 1,95 (s, 3P).

4-(1',2'-epoxipropyl)-phenyl-Tiglinensäureester. $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_3$, $[\eta]_D^{20} = 1,5258$, MS M^+ 232 (13%), m/e 83 (100%), 55 (58%); $\nu_{\text{max}}(\text{Film})$ 1730 cm^{-1} ; $[\delta]_{60\text{ MHz}}^{\text{CDCl}_3}$ CH-3' 1,45 (d, 3 P), CH-2' 3,03 (d + q, 1P), CH-1' 3,60 (d, 1P), CH-2, 3, 4, 6 7, 2 (q, 4P); die Daten des Tiglinoyl-Restes wurden bereits angegeben.

2-Methyl-5-methoxybenzofuran. $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$, $[\eta]_D^{20} = 1,5625$, MS M^+ 162 (100%), 147 (60%), 119 (40%), 91 (28%), 65 (21%); $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3} = 248$ ($\epsilon = 11844$), 292 ($\epsilon = 4375$); 300 ($\epsilon = 3813$); $\delta_{60\text{ MHz}}^{\text{CDCl}_3} = \text{CH-2' } 2,3$ (s, 3P), CH-5' 3,8 (s, 3P), CH-3, 4, 6, 7, 6, 4-7, 4 (m, 4P); $\nu_{\text{max}}(\text{Film}) = 3000\text{ cm}^{-1}$; 2960, 2940, 2840, 1610, 1490, 1450, 1305, 1260, 1200, 1180, 1140, 1115, 1020, 950, 635, 835, 790.

LITERATUR

- Schulte, K. E., Rücker, G. und Backe, W. (1970) *Arch. Pharm.*, **303**, 912.
- Svendsen, A. B. (1954) *Zur Chemie norwegischer Umbelliferen*, John Grundt, Tanum, Verlag, Oslo.
- Wessely, F. und Kallab (1932) *Sitzungsber. Akad. d. Wiss.*, 9/10, 589.
- Wessely, F. und Kallab (1932) *Monatsh. Chemie*, **59**, 161.
- Wessely, F. und Nadler (1932) *Monatsh. Chemie*, **60**, 141.
- Wessely, F. und Nadler (1932) *Sitzungsber. Akad. Wiss.*, **141**, 141.
- Zimmermann, H. (1933) Diss. Würzburg.
- Bohlmann, F. und Zdero, C. (1969) *Tetrahedron Letters*, **13**, 1003.
- Kubeczka, K.-H. (1975) 23. Vortragstagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung in Groningen.
- Stahl, E. (1968) *J. Chromatog.*, **37**, 99.
- Stahl, E. und Herting, D. (1976) *Planta Med.*, **30**, 1.
- Hörhammer, L., Wagner, H. und Lay, B. (1960) *Pharmazie*, **15**, 645.
- Jaretsky und Breitwieser, K. (1937) *Deut. Apoth. Ztg.*, 797.
- Hata, K., Kozawa, M. und Baba, K. (1970) *Tetrahedron Letters*, **50**, 4379.
- Novotny, L., Samek, Z. und Sorm, F. (1966) *Tetrahedron Letters*, **30**, 3541.
- Stahl, E. (1967) *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Stahl, E., Kraus, L. und Gross, H. (1971) *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **73**, 357.