

Pflanzliche Insektizide, III [1]. Pyrethrin I im etherischen Öl von *Chrysanthemum balsamita* L.

Herbal Insecticides III [1]. Pyrethrin I in the Essential Oil of *Chrysanthemum balsamita* L.

Hans Jürgen Bestmann, Beate Claßen, Uwe Kobold, Otto Vostrowsky

Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 42,
D-8520 Erlangen

und

Fred Klingauf

Institut für Biologische Schädlingsbekämpfung der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heinrichstraße 243, D-6100 Darmstadt

Z. Naturforsch. **41c**, 725–728 (1986); received February 11/April 16, 1986

Chrysanthemum balsamita L., Essential Oil, Herbal Insecticides, Pyrethrin I

From the leaves of *Chrysanthemum balsamita* L. an essential oil with insecticidal properties was isolated and the components were analyzed by gas chromatography and mass spectrometry. By means of TLC and HPLC the oil was divided into several fractions, which were examined for their insecticidal activity in a biotest. The activity could be contributed to pyrethrin I which was found for the first time in *C. balsamita*.

Für das etherische Öl des Balsamkrauts, *Chrysanthemum balsamita* L. (Asteraceae), konnten wir insektizide Wirksamkeit gegen Blattläuse nachweisen [1]. Im folgenden berichten wir über weitere Inhaltsstoffe des Balsamkrautöls, über die von uns angewendeten Insektizidtests und das Auffinden von Pyrethrin I als Träger der insektiziden Aktivität des Öls.

Experimenteller Teil

Die Gaschromatogramme wurden mittels des Chromatographen Perkin Elmer Sigma 1 aufgenommen, die Massenspektren mit der GCMS-Kombination Finnigan 3200E mit Datensystem 6000. Zur Aufnahme des ¹H-Kernresonanzspektrums diente das Spektrometer Jeol GX 400, TMS als innerer Standard.

Darstellung des etherischen Öls von *Chrysanthemum balsamita*. – 5,70 kg frisch geerntete Blätter des Balsamkrauts, *C. balsamita*, wurden 21 h mit Wasserdampf destilliert, und das Destillat kontinuierlich mit Pentan extrahiert; Ausb.: 10,40 g wohlriechendes, hellgelbes Öl (0,18%).

Gaschromatographische Analyse

Die Ölzusammensetzung wurde durch temperaturprogrammierte GC-Analyse bestimmt (Abb. 1). Die Identifizierung der Komponenten erfolgte durch Bestimmung der Retentionsindices, wobei das Temperaturprogramm so gewählt wurde, daß die C₉- bis C₁₆-n-Kohlenwasserstoffe mit etwa gleichen zeitlichen Abständen aus der Trennsäule eluiert wurden; 50 m Fused-Silica-Kapillare SE 54, 4 min 60 °C, 3 °C/min. Inject Split: 1:100, Probengeber 220 °C, Detektor FID 260 °C, 14 psig (ca. 1 atm) N₂ (≈ 22 cm/sek.).

GC-kombinierte Massenspektrometrie

25 m Fused-Silica-Kapillare SE30, Direktkopplung, 1,5 ml He/min. 70 eV EI-Spektren, 2 s/Scan. Die Spektren wurden mit denen von authentischen Verbindungen, mit solchen aus der Literatur [2–4] und aus früheren eigenen Arbeiten verglichen.

Dünnschichtchromatographie

578 mg Öl wurde auf präparativen Dünnschichtplatten (2 mm Kieselgel 60 F₂₅₄) mit Ether/Pentan (1:8) als Laufmittel zweimal entwickelt, die unter UV-Licht sichtbaren sechs Fraktionen (R_F = 0,00–0,02, 0,11–0,17, 0,21–0,26, 0,29–0,45, 0,53–0,62 und 0,71–0,85) isoliert und auf insektizide Wirksamkeit getestet. Die bei der Trennung resultierenden „Bandenzwischenräume“ wurden an-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. J. Bestmann.
Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/86/0700–0725 \$ 01.30/0



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 digitized 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.

schließend unter gleichen Bedingungen erneut chromatographiert und auch dem Insektizidtest unterworfen.

Mikropräparative Hochdruckflüssigchromatographie

Die insektizide Dünnschichtfraktion ($R_F = 0,21-0,26$) wurde mittels Reversed-Phase Hochdruckflüssigchromatographie (15 cm \times 4,6 mm RP-18, Eluens 70% $\text{CH}_3\text{CN}/30\% \text{H}_2\text{O}$, 200 bar, 1 ml/min, UV-Detektion bei 220 nm) in drei Fraktionen aufgetrennt, diese wurden gaschromatographisch untersucht und auf insektizide Wirkung getestet.

Isolierung von Pyrethrin I

Die wirksame HPLC-Fraktion wurde nochmals auf RP-18 mit einer Säule höherer Trennleistung (15 cm \times 4,6 mm, Teilchengröße 5 μ) fraktioniert. Kurz nach **78** ließ sich eine Verbindung isolieren, die eine gute UV-Detektion erlaubte, ein Retentionsvolumen V_R von 18 ml besaß und gaschromatographisch dem Signal **108** im Gaschromatogramm des Öls zugeordnet werden konnte.

Insektizidtest

Metopolophium dirhodum und *Acyrtosiphon pisum* wurden im Labor auf Winterweizen, *Triticum aestivum*, bzw. auf Dicke Bohne, *Vicia faba*, gezogen. Jeweils zwei Weizenhalme (Höhe ca. 15 cm), die mit 20–40 Läusen bzw. eine Bohnenpflanze (Höhe ca. 30 cm), die mit 200–300 Tieren besetzt waren, wurden zum Test entnommen, in ein Wassergefäß gestellt, und die Besetzungszahl der Insekten durch Auszählung bestimmt. Das Balsamkrautöl

bzw. die einzelnen Fraktionen wurden in Pentan gelöst oder in Wasser emulgiert (0,02% Emulgator TWEEN-80) und mittels Parfümzerstäuber die Lösungen über die Testinsekten versprüht. Nach 16 h wurde durch Zählen der verbliebenen lebenden Blattläuse die Mortalitäts- bzw. Abwanderungsrate bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Mittels Wasserdampfdestillation wurde aus Blättern von *C. balsamita* 0,18% etherisches Öl gewonnen und dieses vorerst gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht.

Aufgrund der Massenspektren (GC-MS) und der Retentionsindices im Vergleich mit authentischem Material konnten folgende bekannte Inhaltsstoffe von *C. balsamita* identifiziert werden [1] (die Nummern hinter den Verbindungsnamen beziehen sich auf die Nummern der Signale im Gaschromatogramm in Abb. 1): α -Pinen (**3**), Camphen (**5**), Fenchol (**6**), Sabinen (**7**), β -Pinen (**8**), Δ^3 -Caren (**12**), *p*-Cymol (**14**), Limonen (**15**), 1,8-Cineol (**16**), γ -Terpinen (**17**), Terpinolen (**21**), Thujon (**23**), Isothujon (**24**), Carvon (**41**), Perillaaldehyd (**43**), Bornylacetat (**46**), α -Copaen (**51**), *trans*- β -Farnesen (**57**), β -Cuben (**59**) und Zingiberen (**61**).

Zusätzlich gelang jetzt auf gleiche Weise die Zuordnung folgender Substanzen zu den GC-Peaks: Tricyclen (**1**), Thujen (**2**), α -Terpinen (**13**), Linalool (**22**), *t*-Pinocarveol (**27**), Citronellal (**29**), Terpinen-4-ol (**33**), Dihydrocarvon (**35**), Carvacrol (**47**), *t*-Carveylacetat (**48**), Terpinylacetat (**49**), *c*-Carveylacetat (**50**) und Caryophyllen (**54**).

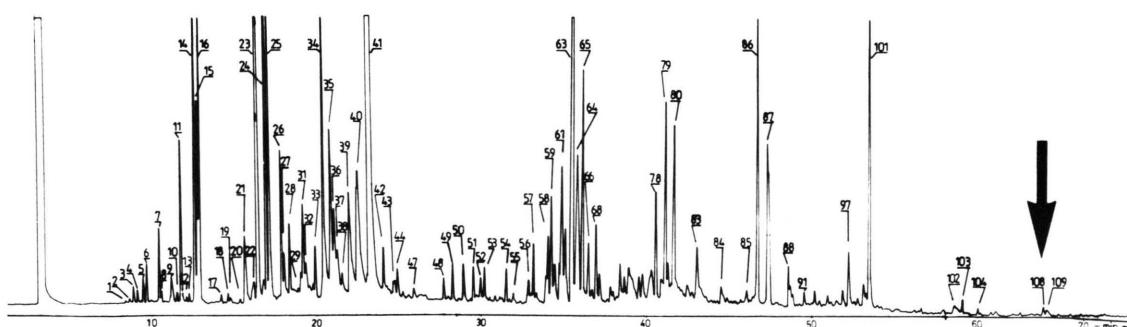


Abb. 1. Gaschromatogramm des etherischen Öls aus *Chrysanthemum balsamita*. (Die Nummern der einzelnen Signale beziehen sich auf die im Text genannten Verbindungen, Pyrethrin I (**108**) ist durch den Pfeil gekennzeichnet.)

Zur Bewertung der Insektizidwirkung des Balsamkrautöls wurden nach der im Experimentellen Teil beschriebenen Methode die Mortalitäts- und Abwanderungsrate bei der Bleichen Getreideblattlaus, *Metopolophium dirhodum* (Walk.), und der Grünen Erbsenblattlaus, *Acyrtosiphon pisum* (Harris), bestimmt. Das Öl rief in 1,5-proz. Spritzverdünnung noch Mortalitätsraten über 90% hervor (vgl. Tab. I).

Das Öl wurde nun dünnenschichtchromatographisch (Laufmittel Ether/Pentan, 1:8) in sechs Fraktionen unterteilt, und diese in Konzentrationen von 400 µg/ml wiederum getestet. Dabei konnte in der Fraktion mit $R_F = 0,21-0,26$, die nach der Hauptmenge ($R_F = 0,29-0,45$, u. a. Carvon **41**) eluiert wurde, die gesamte Toxicität (96% Mortalität) wiedergefunden werden (Tab. I).

Die insektizide Fraktion besteht, wie gaschromatographisch ermittelt wurde, hauptsächlich aus Mono- und Sesquiterpenalkoholen, wobei eine Verbindung mit der Zusammensetzung $C_{15}H_{26}O$ und dem Massenspektrum eines Sesquiterpenalkohols mit Cadinangerüst die Hauptmenge darstellt (Signal Nr. **79** in Abb. 1).

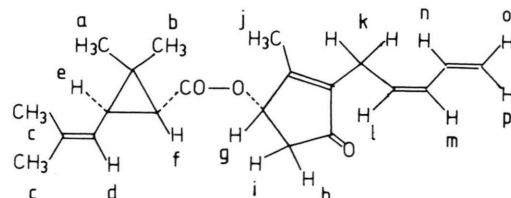
Um zu klären, ob **79** auch der Träger der Insektizidwirksamkeit ist, wurde diese Fraktion anschließend mittels Reversed-Phase-Hochdruckflüssigchromatographie auf RP-18 (CH_3CN/H_2O , UV-Detektion) in vier weitere Fraktionen aufgetrennt und deren biologische Wirksamkeit bestimmt. Die gesamte Wirksamkeit (Tab. I) wurde nun in einer Fraktion gefunden, die kurz nach **79** eluiert wurde und aus einer Verbindung als Hauptmenge bestand, die dem Signal Nr. **78** in Abb. 1 entspricht (gaschromatographisch bestimmt). Das Massenspektrum dieser Sub-

stanz entspricht einem Sesquiterpenalkohol der Zusammensetzung $C_{15}H_{26}O$. Die **78** enthaltende HPLC-Fraktion wurde anschließend erneut mit einer Säule hoher Trennleistung (25 cm × 4,6 mm, 75% $CH_3CN/25\% H_2O$, UV-Detektion 220 nm) chromatographiert, und die Toxizitäten der Fraktionen bestimmt. Die Fraktion mit der stärksten UV-Absorption, die kurz nach **78** eluiert wurde, besaß die volle Insektizidwirkung der Gesamtfraktion (97% Mortalitätsrate bei 1 µg/ml, Tab. I).

Diese insektizide Fraktion wurde nun gaschromatographisch und massenspektroskopisch analysiert und als Pyrethrin I (Formelschema 1) identifiziert, das dem Signal **108** im Gaschromatogramm des rohen Öls (Abb. 1) entspricht.

Zur Strukturabsicherung von **108** wurden die vielstufigen Trennoperationen mit einem großen Ansatz Wasserdampfdestillat wiederholt. Die erhaltenen 0,6 mg **108** erlaubten die Aufnahme eines 1H -NMR-Spektrums, das mit dem Literaturspektrum [5] von Pyrethrin I identisch ist:

1H -NMR ($CDCl_3$, vgl. Schema 1): $\delta = 1,26$ (s, CH_3 , a), 1,14 (s, CH_3 , b), 1,71 (s, CH_3 , c), 1,72 (s,



Schema 1. Strukturformel von Pyrethrin I. (Die mit Buchstaben gekennzeichneten H-Atome beziehen sich auf das 1H -Kernresonanzspektrum.)

Tab. I. Die Bestimmung der insektiziden Wirksamkeit des etherischen Öls aus Blättern des Balsamkrauts, *Chrysanthemum balsamita*, und einzelner Fraktionen mit der Bleichen Getreideblattlaus, *M. dirhodum*, und der Erbsenblattlaus, *A. pisum*. Die Mortalitätsrate bezieht sich auf Prozente der verwendeten Testinsekten.

Testlösung	Konzentration	Mortalitätsrate [%]	
		<i>M. dirhodum</i>	<i>A. pisum</i>
Blattöl aus <i>C. balsamita</i>	15 mg/ml P ^a	99	96
Blattöl aus <i>C. balsamita</i>	13 mg/ml W ^b	100	— ^c
Blattöl aus <i>C. balsamita</i>	1,5 mg/ml P ^a	93	79
Blattöl aus <i>C. balsamita</i>	3,2 mg/ml W ^b	96	— ^c
DC-Fraktion, $R_F = 0,21-0,26$	400 µg/ml P ^a	96	— ^c
HPLC-RP Fraktion 1 (78 + 108)	200 µg/ml P ^a	100	— ^c
HPLC-RP Fraktion 2 (108)	1 µg/ml P ^a	97	—

^a P = n-Pentan.

^b W = Wasser mit 0,02% TWEEN-80 als Emulgator.

^c Aus Gründen der Effektivität nur bei *M. dirhodum* getestet.

CH_3 , c), 4,90 (d, $J_{\text{d,e}} = 7,70$ Hz, $=\text{CH}-$, d), 2,16 (dd, $J_{\text{d,e}} = 7,70$ Hz, $J_{\text{e,f}} = 5,35$ Hz, $-\text{CH}-$, e), 1,40 (d, $J_{\text{e,f}} = 5,35$ Hz, $-\text{CH}-$, f), 5,66 (dd, $J_{\text{g,i}} = 1,50$ Hz, $J_{\text{g,h}} = 6,20$ Hz, $-\text{CH}-$, g), 2,86 (dd, $J_{\text{h,i}} = 18,60$ Hz, $J_{\text{h,g}} = 6,20$ Hz, $-\text{CH}-$, h), 2,23 (dd, $J_{\text{n,i}} = 18,60$ Hz, $J_{\text{i,g}} = 1,50$ Hz, $-\text{CH}_2-$, i), 2,16 (s, $=\text{C}-\text{CH}_3$, j), 3,13 (d, $J_{\text{k,l}} = 8,00$ Hz, $-\text{CH}_2-$, k), 5,36 (dd, $J_{\text{l,k}} = 8,00$ Hz, $J_{\text{l,m}} = 10,90$ Hz, $-\text{CH}=$, l), 6,04 (dd, $J_{\text{m,n}} = 10,90$ Hz, $J_{\text{m,l}} = 10,90$ Hz, $=\text{CH}-$, m), 6,77 (ddd, $J_{\text{n,p}} = 167$ Hz, $J_{\text{n,m}} = 10,90$ Hz, $J_{\text{n,o}} = 10,20$ Hz, $-\text{CH}=$, n), 5,18 (d, $J_{\text{o,n}} = 10,20$ Hz, $=\text{CH}_2$, o) und 5,24 ppm (d, $J_{\text{p,n}} = 16,70$ Hz, $=\text{CH}_2$, p).

In der vorangehenden Arbeit über das Balsamkrautöl konnten wir kein Pyrethrin nachweisen [1]. Dies lag zum einen an der geringen Ölmenge, die zur Verfügung stand, zum anderen an der Abhängigkeit

des Pyrethringehalts vom Erntezeitpunkt der Pflanzen. Während das Kraut damals im Mai und Juni geerntet wurde verfolgten wir diesmal durch Wahl unterschiedlicher Erntezeiten die Pyrethrinkonzentration über die gesamte Saison und fanden ein Maximum im August (0,05% Pyrethrin I, gaschromatographisch bestimmt) und ein Minimum des Gehalts im Frühsommer (0,03%).

Wir danken dem Bundesministerium für Forschung und Technologie für die Unterstützung unserer Arbeiten und Herrn Prof. Dr. H. P. Thier, Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster, für die Überlassung von Referenzproben von Pyrethroiden.

- [1] II. Mitt.: H. J. Bestmann, B. Claßen, U. Kobold, O. Vostrowsky, F. Klingauf, H. Strobel und K. Knobloch, Z. Naturforsch. **39c**, 543 (1984).
- [2] E. Stenhammar, S. Abrahamsson und W. F. McLafferty, Registry of Mass Spectral Data, J. Wiley & Sons, New York 1974.
- [3] Y. Masada, Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry, J. Wiley & Sons, New York 1976.
- [4] W. Jennings und T. Shibamoto, Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles by Glass-Capillary Gas Chromatography, Academic Press, New York, London, Sidney, Toronto, San Francisco 1980.
- [5] G. Pattenden, L. Crombie und P. Hemesley, OMS **7**, 719 (1973).