

Pharmazeutisches Institut¹ Universität Bonn, Germany and College of Pharmacy², Kang Weon National University, Chuncheon, Korea

Angelicastigmin, ein neues Alkaloid vom Eserintyp aus *Angelica polymorpha*

P. PACHALY¹, A. KROLL-HORSTMANN^{1,3} und K. S. SIN²

Aus den Wurzeln von *Angelica polymorpha* Maxim. wurde ein neues Alkaloid Angelicastigmin (**1**) aus der seltenen Gruppe der Eserin-Alkaloide isoliert und die Struktur mit spektroskopischen Methoden aufgeklärt.

Angelicastigmin, a new eserine alkaloid from *Angelica polymorpha*

Angelicastigmine (**1**), which belongs to the relatively seldom group of eserine alkaloids, was isolated as new alkaloid from the roots of *Angelica polymorpha* Maxim. The structure was elucidated by spectroscopic methods.

1. Einleitung

Die getrockneten Wurzeln von *Angelica polymorpha* Max. werden in der koreanischen Volksmedizin mit ähnlicher Indikation wie *Angelica gigas*, über deren Inhaltsstoffe wir vor einiger Zeit berichteten [1], als Analgetikum bei Kopfschmerzen, als Emmenagogum und als Sedativum in Form einer wässrigen Teezubereitung eingesetzt. Das pharmakologische Screening eines wässrigen Extraktes hatte für *A. polymorpha* lediglich eine Wirksamkeit gegen akute Entzündungen ergeben [2]. Bisher wurden aus dieser *Angelica*-Art nur relativ unpolare Cumarine beschrieben [3]. Die Isolierung möglicherweise wirksamer Bestandteile aus den polaren, wasserlöslichen Extraktfraktionen sollten in Hinblick auf eine genauere pharmakologische Untersuchung weitere Informationen zur Wirksamkeit dieser Arzneipflanze geben. Wir haben aus den polaren Extraktfraktionen der Wurzel von *A. polymorpha* neben einigen neuen Cumaringlykosiden, über die später berichtet werden wird [4], als neues Alkaloid Angelicastigmin (**1**) isolieren können. Hier soll über die Strukturaufklärung von **1** berichtet werden.

2. Untersuchungen und Ergebnisse

Angelicastigmin (**1**) wurde aus dem Butanolextrakt durch mehrfache SC an Sephadex LH 20 und weitere SC-Aufreinigung an Kieselgel als bräunlich-amorphe Substanz isoliert, die sich auf dem DC mit Anisaldehyd/Schwefelsäure zunächst auffällig blau anfärbt, nach kurzer Zeit aber rosa verfärbt. Im EI MS (Hochauflösung) erscheint bei 366, 1579 der Molekülpeak von **1**, aus dem sich die Summenformel $C_{21}H_{22}N_2O_4$ errechnet. Nach Abspaltung von CO_2 ($M-44$ m/z) erfolgt der weitere Zerfall zu ganz analogen Bruchstücken, wie sie das Physostigmin im MS ergibt [5]. Aus den 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren, insbesondere durch Auswertung der H,H-COSY-, APT-, HECTOR- und CH-COLOC-Spektren (Abb.) lässt sich die Struktur von **1** eindeutig ableiten.

Zwischen 6,6 und 7,3 ppm erscheinen die Signale von 7 aromatischen Protonen, zwischen 5,78 und 6,35 ppm erkennt man Signale von 2 olefinischen Protonen. Im Be-

reich der Multipletts aliphatischer Protonen erkennt man bei 3,79 ppm das typische Singulett einer O-Methylgruppe. Als weitere funktionelle Gruppe gibt sich die COOH-Gruppe im ^{13}C -NMR bei 173,3 ppm zu erkennen. Im H,H-COSY-Spektrum lassen sich als Teilstrukturen ein ortho-disubstituierter und ein 1,2,4-trisubstituierter Phenylrest ableiten. Die Signale der beiden olefinischen Protonen H-7' und H-8' zeigen eine Allylkopplung mit den beiden Protonen H-9'a und H-9'b sowie eine typische trans-Kopplungskonstante von $J = 15,5$ Hz. Weitere Kopplungen lassen sich an dieser Teilstruktur nicht erkennen, so dass C-7' ebenso wie C-9' an jeweils quartären C-Atomen gebunden sein müssen. Aus der Tieffeldverschiebung des Signals von H-7' ergibt sich die Nachbarschaft zu einem Phenylrest. Eine weitere Teilstruktur lässt sich im H,H-COSY-Spektrum aus dem AB-System von H-3a und H-3b bei 2,34 und 2,69 ppm erkennen, das mit dem Proton H-2 bei 3,65 ppm koppelt. Das ^{13}C -Signal von C-2 bei 61,65 ppm spricht für die Verknüpfung mit einem N-Atom. Ein Singulett bei 5,35 ppm für ein Methinproton, dessen ^{13}C -Signal bei 83,0 ppm erscheint, weist auf die Nachbarschaft von 2 N-Atomen hin. Die

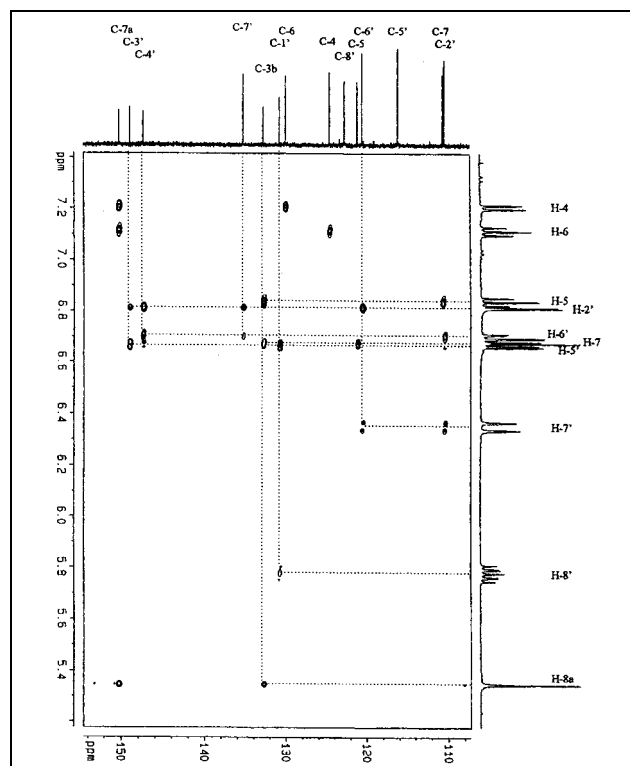
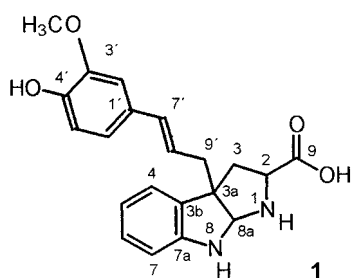


Abb.: Ausschnitt aus dem CH-COLOC-Spektrum von Angelicastigmin (**1**) (d-Methanol, 500/125 MHz)

Tabelle 1: ^1H -NMR-Signale von Angelicastigmin (**1**) (CD_3OD , 300 MHz)

Proton	δ (ppm)	Multiplizität	J (Hz)
H-2	3,68	dd	11,4/6,0
H-3a	2,69	dd	13,0/6,0
H-3b	2,34	dd	13,0/11,4
H-4	7,21	ddd	7,5/1,3/0,5
H-5	6,84	ddd	7,5/7,5/1,0
H-6	7,11	ddd	7,6/7,5/1,3
H-7	6,67	ddd	7,6/1,0/0,5
H-8a	5,35	s	
H-2'	6,82	d	1,9
H-5'	6,66	d	8,1
H-6'	6,71	dd	8,1/1,9
H-7'	6,35	d (br)	15,5
H-8'	5,78	ddd	15,5/8,5/6,0
H-9'a	2,73	ddd	14,0/6,5/1,5
H-9'b	2,55	ddd	14,0/8,5/0,8
H-10	3,79	s	

Tabelle 2: ^{13}C -NMR-Signale von Angelicastigmin (**1**) (CD_3OD , 75 MHz) im Vergleich zum Feruloylteil von 1-O-Feruloyl- β -D-glucopyranose (**2**) [6]

C-Atom	δ (ppm)	
	1	2
C-2	61,7	
C-3	42,6	
C-3a	60,1	
C-3b	132,6	
C-4	124,4	
C-5	121,1	
C-6	129,9	
C-7	110,6	
C-7a	150,1	
C-8a	83,0	
C-9	173,3	
C-1'	130,6	127,4
C-2'	110,4	111,7
C-3'	148,8	150,8
C-4'	147,2	149,2
C-5'	116,0	116,4
C-6'	120,5	124,2
C-7'	135,1	148,1
C-8'	122,6	114,6
C-9'	42,9	
C-10'	56,3	

Verknüpfung dieser Struktureinheiten lässt sich eindeutig aus dem CH-COLOC-Spektrum (Abb.) ableiten.

Die chemischen Verschiebungen, Kopplungen und Multiplizitäten der Protonensignale zeigt Tabelle 1, die Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale Tabelle 2. Die Verteilung der OH-Gruppe und Methoxy-Gruppe am Phenylring ergibt sich aus den Signallagen der ^{13}C -NMR-Signale im Vergleich zu den entsprechenden Signalen von 1-O-Feruloyl- β -D-glucopyranose (**2**) [6]. Lediglich über die Chiralitätszentren C-2, C-3a und C-8a lässt sich mit den vorhandenen Messergebnissen noch keine Aussage machen.

3. Diskussion

Mit Angelicastigmin (**1**) haben wir ein weiteres Beispiel der seltenen Eserin-Alkaloide gefunden, die bisher nur in wenigen Gattungen der Fabaceae und Euphorbiaceae entdeckt wurden. Für die Gattung *Angelica* ist **1** ein neuer und ungewöhnlicher Inhaltsstoff. Ein pharmakologisches Screening ließen bisher die isolierten, sehr geringen Substanzmengen von **1** bisher nicht zu.

4. Experimenteller Teil

4.1. Allgemeine Angaben

UV: HP 8452 A Dioden-Array-Spektrophotometer (Hewlett-Packard); IR: IR-Spektrometer 298 (Perkin-Elmer); optische Drehung: Polarimeter 251 (Perkin-Elmer); MS: FAB-MS: Concept 1 H (Kratos), EIMS: MS 50 (Kratos); NMR: Varian XL 300 (Varian), Bruker AMX 500; DC und SC: Kieselgel 60, Kieselgel RP 8, Kieselgel RP 18, Lobar Lichroprep RP 18 (Merck), Dextrangel Sephadex LH 20 (Pharmacia); Pflanzenmaterial: Das Pflanzenmaterial wurde in Korea von Prof. Dr. W. C. Lee und Prof. Dr. K. S. Sin (College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200–701, Korea) gesammelt und identifiziert. Ein Herbarexemplar befindet sich bei W. C. Lee.

4.2. Extraktion der Droge

3,085 kg der getrockneten unterirdischen Teile von *Angelica polymorpha* Maxim. wurden zunächst viermal mit 151 Petrolether (40/60) über 270 h mazeriert, wobei aus dem Mazerat 207 g (6,7% der getrockneten Droge) eines relativ dünnflüssigen und aromatischen Öls abgetrennt wurden. Anschließend wurde die Droge viermal mit insgesamt 13,5 l Ethylacetat 200 h mazeriert und 69,5 g (entsprechend 2,3% der eingesetzten Droge) eines öligen Extrakts abgetrennt. Danach wurde die Droge viermal mit insgesamt 14 l Methanol über 174 h mazeriert, wobei aus dem Methanolextrakt 244,6 g (entsprechend 7,9% der eingesetzten Droge) eines harzigen, hellbraunen Extrakts erhalten wurden.

Zur Vortrennung der polaren Inhaltsstoffe wurde 105 g Methanol-Trockenextrakt in 650 ml Methanol aufgenommen und nach zweitägigem Stehen aus der Lösung 36 g kristalline Saccharose abgetrennt. Das Filtrat wurde zur Trockene eingeeengt, mit 200 ml Wasser suspendiert, mehrmals mit insgesamt 11 Ethylacetat, und anschließend mit insgesamt 300 ml *n*-Butanol ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen lieferten 8,9 g glykosidhaltigen Trockenextrakt, die Butanolphase ergab 16,8 g Trockenextrakt, in dem das Angelicastigmin enthalten ist, in der Wasserphase verblieben 42,8 g zucker- und salzhaltiger Trockenextrakt.

4.3. Isolierung von Angelicastigmin (**1**)

Aus dem nach 4.1. erhaltenen Trockenextrakt der Butanolphase (16,8 g) wurde **1** durch mehrfache SC über Sephadex LH 20 und Kieselgel rein als schwach bräunliche, amorphe Substanz erhalten. Dazu wurden 4 g des Trockenextrakts über eine Säule mit Sephadex LH 20 ($173 \times 3,5$ cm) mit einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch (8:2) und einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgetrennt. Die Fraktion mit Ve 2150–2250 ml ergab 1,3 g Rückstand, der erneut unter gleichen Bedingungen bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgetrennt wurde. Die Fraktion Ve 1795–1890 ml lieferte 316 mg Angelicastigmin-haltigen Rückstand, der erneut über Sephadex LH 20 ($173 \times 3,5$ cm) mit einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch (8,5:1,5) und einer Fließgeschwindigkeit 0,7 ml/min aufgetrennt wurde. Die Fraktion Ve 1845–1935 ergab 49 mg Rückstand, aus dem über eine Kieselgelsäule ($63\text{--}100\ \mu\text{m}$, $18 \times 0,7$ cm) mit einem Ethylacetat/Methanol/Wasser-Gemisch (75:22,5:2,5) mit einem Ve von 40–60 ml rohes **1** erhalten wurde, das nach erneuter SC über eine Kieselgelsäule ($63\text{--}100\ \mu\text{m}$, $13 \times 0,7$ cm) mit dem gleichen Fließmittelgemisch und einem Ve 24–54 ml 9,2 mg dc-reines **1** ergab.

4.4. Charakterisierung von Angelicastigmin (**1**)

Schwach bräunliche amorphe Substanz $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ Mr 366,157958 (HRMS), $[\alpha]_D^{20}$ $-92,0^\circ$ ($c = 0,79$, MeOH), DC: Kieselgel 60, FM $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:18:2), Rf 0,17, intensive UV-Lösung bei 254 nm, Blaufärbung mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 bei 70°C , bei Erhitzen auf 120°C Rosafärbung.

UV (MeOH; λ_{max} [nm] (ϵ): 212 (18740), 268 (10748), 292 (6750); NMR: siehe Tabellen 1 u. 2 sowie Abb. 2; EI-MS: 70 eV, m/z (% rel. Intensität): 366 (14,0), 322 (16,0), 293 (6,2), 279 (16,8), 278 (17,7), 215 (28,0), 203 (20,0), 182 (19,0), 169 (27,3), 169 (34,0), 159 (34,0), 157 (32,0), 131 (52,0), 130 (100), 45 (68,0).

Danksagung: K. S. Sin dankt der Korean Research Foundation für die Förderung der Arbeit durch Sachmittel.

³ Teil der Dissertation von A. Kroll-Horstmann, Universität Bonn 1995

Literatur

- Pachaly, P.; Treitner, A.; Sin, K. S.: Pharmazie **51**, 57 (1996)
- Kim, C. M.; Moon, Y. H.; Kim, H. P.; Sin, K. S.; Pachaly, P.: Arch. Pharm. Res. (Korea) **14** (1), 87 (1991)
- Hata, K.; Kozawa, M.; Ikeshiro, Y.: Yakugaku Zasshi **87**, 464 (1967)
- Pachaly, P.; Kroll-Horstmann, A.; Sin, K. S.: in Vorbereitung
- Hesse, M.: Fortschritte der Massenspektrometrie, Bd. 1, Indolalkaloide, S. 236, VCH Weinheim 1974
- Opitz, M.; Pachaly, P.; Sin, K. S.: Pharmazie **54**, 218 (1999)

Eingegangen am 21. Februar 2000
Angenommen am 11. April 2000

Prof. Dr. Peter Pachaly
Im Moos 1
D-79872 Bernal