

ZWEI NEUE PSEUDOGUAIANOLIDE AUS DEN BLÜTEN VON ARNICA CHAMISSONIS LESS. SUBSP. GENUINA MAGUIRE

G. WILLUHN*, G. PRETZSCH und D. WENDISCH

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf, D-4000 Düsseldorf, und Zentralbereich
Forschung und Entwicklung der Bayer AG, D-5090 Leverkusen-Bayerwerk, West Germany

(Received in Germany 23 April 1980; in revised form 28 May 1980)

Zusammenfassung—Aus den arzneilich verwendeten Blütenköpfchen von *Arnica chamissonis* Less subsp. *genuina* Maguire wurden die zwei dominierenden Sesquiterpenlactone isoliert. Es handelt sich um neue Pseudoguaianolide, die als Chamissonolid (1) und 6-Desoxychamissonolid (2) bezeichnet werden. Ihre Struktur wurde durch UV-, IR-, MS-, ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren aufgeklärt.

Abstract—The predominant sesquiterpene lactones from the flowers of *Arnica Chamissonis* Less. subsp. *genuina* Maguire, which are used for medical purposes, were isolated. They are shown to be new compounds of the pseudoguaianolide type, which are named Chamissonolide (1) and 6-Desoxychamissonolide (2). Their structure has been established by UV, IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR.

EINLEITUNG

In der Gattung *Arnica* (Asteraceae) sind in den letzten Jahren Sesquiterpenlactone vom Pseudoguaianolid- und Xanthanolid-Typ nachgewiesen worden.¹⁻⁷ Sie sind als wesentliche Wirkstoffe der arzneilich verwendeten Blüten von *Arnica montana* anzusehen.^{4,7-9} *Arnica chamissonis* Less. wird von einigen Arzneibüchern als gleichwertige Stammpflanze neben *A. montana* für die "Arnicae Flos" zugelassen. Die vorliegende Untersuchung beschreibt die Isolierung und Identifizierung von zwei neuen Pseudoguaianoliden, die als dominierende Sesquiterpenlactone in den Blüten von *Arnica chamissonis* Less. subsp. *genuina* Maguire vorkommen und für die die Namen Chamissonolid (1) und 6-Desoxychamissonolid (2) vorgeschlagen werden.

Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid

Die getrockneten Blütenköpfchen lieferten in 0,05-proz. Ausbeute kristallines Chamissonolid (1), Schmp. 202–203,5°, $[\alpha]_D^{20} + 54,8^\circ$, das nach Massenspektrum und CH-Analyse die Summenformel C₁₇H₂₄O₆ besitzt. Nach Acetylierung erscheint im Massenspektrum der Molpeak bei M⁺ = 408, was das Vorliegen von 2 freien OH-Gruppen belegt. Das UV-Spektrum weist mit dem Absorptionsmaximum bei 205,8 nm ($\epsilon = 11.167$) auf ein Sesquiterpenlacton mit einer Exomethylengruppe in α,β -Stellung zur Ketogruppe des Lactonringes hin.¹⁰ Das IR-Spektrum zeigt Signale für eine Exomethylengruppe (812, 1270, 1658 und 3090 cm⁻¹), für die Ketogruppe des γ -Lactonringes (1760 cm⁻¹), für 2 freie Hydroxylgruppen (3466 und 3380 cm⁻¹) und eine bereits aus der Summenformel zu schliessende Acetatgruppierung (1725 cm⁻¹).

6-Desoxychamissonolid (2) fiel in 0,004-proz. Ausbeute kristallin an, Schmp. 204–206,5°, $[\alpha]_D^{20} + 57,1^\circ$. Nach Massenspektrum (M⁺ = 308) und CH-Analyse besitzt es die Summenformel C₁₇H₂₄O₅ und ist damit offenbar um eine OH-Gruppe ärmer als 1. Das UV-Absorptionsmaximum bei 212,8 nm ($\epsilon = 10712$) deutet auch hier auf eine Exomethylengruppe am γ -Lactonring hin. Das IR-Spektrum zeigt deutliche Übereinstimmungen mit dem von 1, doch tritt hier das Signal für nur eine freie Hydroxylgruppe (3435 cm⁻¹) auf, die durch die Bildung eines Acetats (M⁺ = 350) bestätigt wird.

Dem ¹³C-Spektrum beider Verbindungen ist zu entnehmen, dass sie beide 17 C-Atome besitzen, von denen jeweils 4 sp²-hybridisiert sind. Aus den "gated decoupling"-Experimenten ergeben sich folgende Atomsorten:

	1	2
	4	4
CH	7	6
CH ₂	3	4
CH ₃	3	3

Die Anwesenheit eines quartären C-Atoms neben Sauerstoff kann für beide Verbindungen ausgeschlossen werden. Der Vergleich der chemischen Verschiebungen (s. Tabelle 1) zeigt, dass 1 ein viertes CH neben Sauerstoff besitzt ($\delta = 77,034$ ppm), während dafür bei 2 eine Ring-Methylengruppe eine chemische Verschiebung von $\delta = 42,359$ ppm hervorruft. Das einzige sp³-hybridisierte quartäre C-Atom absorbiert in 2 bei $\delta = 47,010$ ppm und ist bei 1 um 5,550 ppm nach tieferem Feld verschoben. Das bedeutet, dass in 1 die zusätzliche Hydroxylgruppe in Nachbarstellung zum quartären Kohlenstoff lokalisiert sein muss. Diese OH-Gruppe ruft auch auf C-7 einen ähnlichen β -Effekt von 6,173 ppm hervor. Danach muss 2 das 6-Desoxyderivat von 1 sein. In 1 ist weiterhin C-11 um 3,737 ppm im Vergleich zu 2 nach höherem Feld verschoben, während für C-13 eine Tieffeldverschiebung von 4,016 ppm resultiert. Die CH₃-Gruppe an C-5 erfährt in 1 eine Hochfeldverschiebung von 2,291 ppm.

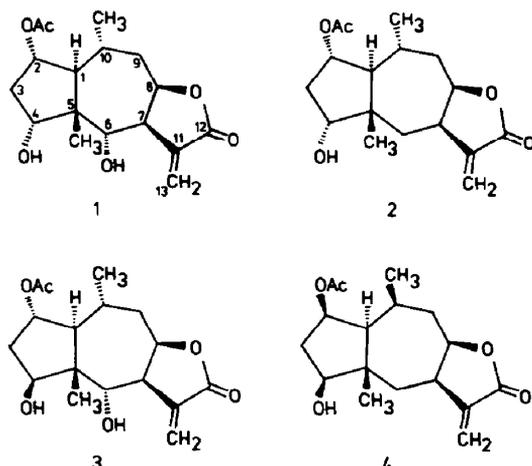
Im ¹H-NMR-Spektrum beider Verbindungen erscheinen die Protonen der Exomethylengruppe am γ -Lactonring und die CH₃-Gruppen an C-5 bzw. C-10 mit für Pseudoguaianolide zu erwartenden chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsbildern (s. Tabelle 2 bzw. 3) Die Acetylgruppe erscheint bei 2,075 (1) bzw. 2,066 ppm (2). Das Signal der freien OH-Gruppe von 2 erscheint bei 1,645 ppm und kann nach H/D-Austausch mit D₂O nicht mehr beobachtet werden. Ein hier um 3,726 ppm zentriertes Signal kann dem Proton an demjenigen C-Atom zugeschrieben werden, das die freie OH-Gruppe trägt, da es nach Acetylierung nach tieferem

Tabelle 1. ^{13}C -Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS=0) von Chamissonolid (1) und 6-Desoxychamissonolid (2) in Aceton- D_6

C-Atome	1	2
1	49.710	51.070
2	80.050	79.478
3	40.994	40.590
4	77.846	77.524
5	52.560	47.010
6	77.034	42.359
7	47.622	41.449
8	80.580	80.773
9	36.885	36.176
10	—*	—**
11	138.724	142.461
12	170.174	169.023
13	125.534	121.518
CH_3 an C-5	19.950	22.241
CH_3 an C-10	20.613	20.792
CH_3 von OAc	21.210	21.247
CO von OAc	170.837	169.983

*Unter Solvens-Septett fallend; δ (in CDCl_3) = 28.580 ppm.**Unter Solvens-Septett fallend; δ (in CDCl_3) = 28.930 ppm.

Feld verschoben wird. Entkopplungsexperimente führten zu der in Tabelle 2 und 3 aufgelisteten Zuordnung der Signale des Pseudoguaianolid-Ringsystems dieser Verbindungen. Danach handelt es sich bei 1 um ein Stereoisomeres von Picrohelenin (3), das aus *Helenium autumnale* isoliert wurde,¹¹ und bei 2 um ein Stereoisomeres von Stevin (4),¹² von denen sich die hier beschriebenen Verbindungen bereits durch Schmelzpunkt und spez. Drehung unterscheiden (Picrohelenin: Schmp. 170° ; Stevin: Schmp. $184\text{--}186^\circ$, $[\alpha]_D^{20} + 161^\circ$).



Zur Klärung der Stereochemie in 1 wurden $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Messungen vorgenommen. Aus biogenetischen Gründen kann angenommen werden, dass der Lactonring an C-7 β -verknüpft ist, wie dies für alle bisher bekannten Pseudoguaianolide zutrifft. Die Kopplungskonstante der H-7/H-8-Protonen zeigt einen Wert von 8.0 Hz, was für eine 7 β , 8 β -*cis*-Verknüpfung des Lactonringes spricht,⁶ die auch bei allen anderen aus *Arnica*-Arten isolierten Sesquiterpencilactonen vorliegt.¹⁻⁷ Im Einklang mit der Struktur eines *cis*-Lactonringes steht weiterhin die unter 3 Hz liegende allylische Kopplung der C-13-Protonen.¹³

Die Einstrahlung auf die Methylgruppe an C-10 führte zu einer über 20-proz. Steigerung der Signalintensität von H-8. Aufgrund dieses Kern-Overhauser-Effektes (NOE) ist die Methylgruppe an C-10 wie das Proton an C-8 α -ständig anzuordnen. Aus der relativ grossen Kopplungskonstanten von 10.2 Hz ergibt sich für die H-6/H-7-Protonen eine *trans*-Stellung, was bedeutet, dass die OH-Gruppe an C-6 wie beim Picrohelenin¹¹ α -ständig ist.

Tabelle 2. $^1\text{H-NMR}$ -Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) und Kopplungskonstanten J (Hz) von Chamissonolid (1) in CDCl_3

Protonen	ppm	J	Hz
1	2,366	1,2	8,2
2	4,885	2,3a	9,2
3a	2,721	2,3b	3,0
3b	1,483	3a,3b	(-) 16,0
4	4,093	3a,4	5,5
6	3,716	6,7	10,2
7	3,548	7,8	8,0
8	4,823	10, - CH_3	6,8
9a	1,85 bis 2,12	7,13	2,0
9b	1,85 bis 2,12	13a,13b	<0,5
10	1,965		
13a	6,363		
13b	5,853		
CH_3 an C-5	0,933		
CH_3 an C-10	1,100		
OAc an C-2	2,075		
-OH an C-4	1,85 bis 1,96		
-OH an C-6	3,185		

Die für 1 ermittelten ^1H -Daten stimmen mit den für das stereoisomere Picrohelenin angegebenen überein mit Ausnahme derjenigen für H an C-4 (4.37 anstelle von 4.093 ppm) und CH_3 an C-5 (1.10 anstelle von 0.933 ppm). Danach sollte sich 1 von Picrohelenin (3) nur durch die sterisch andere Stellung der Hydroxylgruppe an C-4 unterscheiden, d.h. hier α -ständig sein. Dem neuen, aus *Arnica chamissonis* isolierten Pseudoguaianolid kommt somit die Struktur 1 zu, für die wir den Namen Chamissonolid vorschlagen. Die in 1 angegebene Konfiguration ist inzwischen durch eine Röntgenstrukturanalyse bestätigt worden. Wie von anderen Autoren bereits berichtet, lässt sich auch bei Kenntnis der absoluten Konfiguration an C-1 und C-5 des fünfgliedrigen Ringes der Pseudoguaianolide aus den Kopplungskonstanten der Protonen an C-1, C-2, C-3 und C-4 keine sichere Zuordnung der Stereochemie an C-2 und C-4 treffen.¹⁴

Die ^1H -NMR-Daten der zweiten isolierten Verbindung (s. Tabelle 3) sprechen wie die ^{13}C -Daten dafür, dass sich diese Verbindung von 1 lediglich durch das Fehlen der OH-Gruppe an C-6 unterscheidet. Damit kommt ihr die Struktur 2 zu und sie kann als 6-Desoxychamissonolid bezeichnet werden. Die α -Konfiguration der OH-Gruppe an C-4 ergibt sich auch aus dem ^1H -NMR-Signal des Protons an C-4, das hier als Dublett erscheint. Daraus darf abgeleitet werden, dass es sich in *cis*-Position zu der aus biogenetischen Gründen als β -ständig anzunehmenden Methylgruppe an C-5 befindet. Wäre es α -ständig (d.h. *trans*), dann sollte daraus ein Dublett vom Dublett resultieren.¹⁵

EXPERIMENTELLER TEIL

Die ^1H -NMR-Spektren wurden bei 360 MHz im PFT-Verfahren an einem Spektrometer WH-360 der Fa. Bruker-Physik, Rheinstetten, gemessen. Die in den Tabellen 2 und 3 angegebenen Werte beziehen sich auf die deuteriochloroformischen Lösungen. Tetramethylsilan wurde als interner Standard verwendet. Die gepulsten Homokopplungen sowie die NOE-Messungen wurden am gleichen Spektrometer, das mit dem Rechner Aspect 2000 und einer interaktiven Disk in Verbindung stand, durchgeführt. Die ^{13}C -Spektren wurden bei 90.52 MHz

unter Protonen-Rauschentkopplung und unter Bedingungen des "gated decoupling" ebenfalls am Spektrometer WH-360 gemessen. Die in Tabelle 1 angegebenen Verschiebungswerte beziehen sich auf die deuterioacetischen Lösungen, wobei TMS als Referenz diente. Zur Auffindung von C-10 wurden 1 und 2 auch in Deuteriochloroform vermessen.

Die IR-Spektren wurden in KBr mit dem Spektralphotometer 297 der Fa. Perkin-Elmer, die UV-Spektren in Ethanol mit dem Spektralphotometer 25 der Fa. Beckman bei 20° und die Massenspektren mit dem Massenspektrophotometer Varian MAT CH-7-A aufgenommen. Die spezifische Drehung wurde mit dem Polarimeter 243 der Fa. Perkin-Elmer und die Schmelzpunkte mit dem Leitz Mikroskopheiztisch 350 bestimmt. Sie sind nicht korrigiert.

Isolierung

Arnica chamissonis Less. subsp. *genuina* Maguire wurde auf dem Versuchsfeld des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Giessen, Versuchsstation Rauschholzhäusern, kultiviert. Die Blütenköpfchen wurden bei 40–50° getrocknet (1.78 kg), pulverisiert und mit Benzol im Soxhlet-Extraktor erschöpfend extrahiert. Der bis zur sirupösen Konsistenz eingeeengte Extrakt wurde 10× mit jeweils 300 ml 60-proz. Ethanol ausgezogen und dieser Auszug nach Abdampfen des Ethanols intensiv mit Chloroform ausgeschüttelt. Der Rückstand des Chloroformextraktes wurde zur Reinigung mit einem Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanolgemisch (5:4:1:2) über eine Säule mit 1.2 kg Aluminiumoxid filtriert¹⁶ und die gereinigte Fraktion (8.77 g) anschließend an 1 kg Kieselgel 60 (Merck) mit n-Pentan/Ether (32:68) säulenchromatographisch aufgetrennt. Hierbei wurden 2.64 g einer Fraktion mit 1 und 2 erhalten. Erneute Chromatographie dieser Fraktion an 425 g Alumina Woelm N Super I mit Ethylacetat/Ether (50:50) lieferte 77.6 mg kristallines 2. Durch anschließende Elution mit Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol (5:4:1:2) wurden 910 mg 1 kristallin erhalten.

Chamissonolid (1): Schmp. nach Umkristallisation aus Ethanol 202–203.5°; $[\alpha]_D^{25} + 54.81^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1.113$). DC an Kieselgel 60 F_{254} -Fertigplatten (Merck), System I: n-Pentan/Ether (32:68), $R_f = 0.11$; System II: Ethylacetat/Ether (50:50), $R_f = 0.62$; Färbung mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 : schmutziggelblich. UV: λ_{max} 205.8 nm, Ethanol ($\epsilon = 11167$); IR: 3460 und 3380 cm^{-1} (OH-Gruppe an C-2 und C-4), 1760 cm^{-1} (Ketofunktion des γ -Lactonringes), 1725 cm^{-1} (Acetylgruppe an C-2), 3090, 1658, 1270 und 812 cm^{-1} (Exomethylengruppe); CH-Analyse: Gef. C, 63.17; H,

Tabelle 3. ^1H -NMR-Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) und Kopplungskonstanten J (Hz) von 6-Desoxychamissonolid (2) in CDCl_3

Protonen	ppm	J	Hz
1	2,158	1,2	8,2
2	4,875	2,3a	9,2
3a	2,763	2,3b	3,0
3b	1,500	3a, 3b	(-) 16,0
4	3,726	3a, 4	5,1
6a	1,95 bis 2,17	6a, 6b	(-) 14,5
6b	1,546	6b, 7	13,2
7	3,558	7, 8	8,0
8	4,816	8, 9a	8, 8
9a	1,95 bis 2,17	8, 9b	3,5
9b	1,841	10, -CH ₃	6, 8
10	1,925	7, 13	2, 2
13a	6,275	13a, 13b	<0,5
13b	5,665		
CH ₃ an C-5	0,858		
CH ₃ an C-10	1,100		
OAc an C-2	2,066		
-OH an C-4	1,645		

7.50; O, 29.32; Ber. für $C_{17}H_{24}O_6$: C, 62.97; H, 7.41; O, 29.62%; ($M^+ = 324$). ^{13}C - und 1H -NMR-Daten s. Tabellen 1 und 2.

6-Desoxychamissonolid (2): Schmp. nach Umkristallisation aus Ethanol 204–206.5°; $[\alpha]_D^{25} + 57.14^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 1.160$). DC im System I: $R_f = 0.16$; System II: $R_f = 0.69$; Färbung mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 : lila. UV: λ_{max} 212.8 nm, Ethanol ($\epsilon = 10712$); IR: 3435 cm^{-1} (OH-Gruppe an C-4), 1735 cm^{-1} (Ketofunktion des γ -Lactonringes), 1720 cm^{-1} (Acetylgruppe an C-2), 3090, 1658, 1270, 812 cm^{-1} (Exomethylengruppe); CH-Analyse: Gef. C, 65.69; H, 7.73; O, 26.58; Ber. für $C_{17}H_{24}O_5$: C, 66.23; H, 7.79; O, 25.97%. ($M^+ = 308$). ^{13}C - und 1H -NMR-Daten s. Tabellen 1 und 3.

Darstellung der Acetylderivate: 3 mg von 1 bzw. 2 wurden unter gelindem Erwärmen in 0.5 ml Pyridin gelöst und mit 0.5 ml Acetanhydrid versetzt.

Danksagung—Frau Professor Dr. A. Vömel danken wir für den Anbau der Pflanzen, der mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft erfolgte. Herrn Professor Dr. D. Mootz, Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Universität Düsseldorf, danken wir für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse und Herrn Dr. U. Matthiesen, Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf, für die Aufnahme der Massenspektren.

LITERATUR

- ¹R. I. Evstratova, V. J. Sejcenko, K. S. Rybalko und A. J. Bankovskij, *Chim. Pharm. Z.* 3, 39 (1969).
- ²J. Poplawski, M. Holub, Z. Samek und V. Herout, *Coll. Czech. Commun.* 36, 2189 (1971).
- ³M. Holub, Z. Samek und J. Toman, *Phytochemistry* 11, 2627 (1972).
- ⁴P. H. List und B. Friebe, *Arzneimittel-Forsch.* 24, 148 (1974).
- ⁵G. Willuhn und H.-D. Herrmann, *Arch. Pharm.* 309, 333 (1976).
- ⁶H.-D. Herrmann, G. Willuhn und B. M. Hausen, *Planta med.* 34, 299 (1978).
- ⁷G. Willuhn und H.-D. Herrmann, *Ibid.* 37, 325 (1979).
- ⁸B. M. Hausen, H.-D. Herrmann und G. Willuhn, *Contact Derm.* 4, 3 (1978).
- ⁹K. S. Rybalko, E. A. Trutnew und B. N. Kibaltschitsch, *Aptet-schonoje Delo, Moskau* 14, 32 (1965).
- ¹⁰P. G. Deuel und T. A. Geismann, *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3778 (1957).
- ¹¹Y. Kondo, T. Tomimori, N. Hiraga und T. Takemoto, *Heterocycles* 5, 373 (1976) und 6, 19 (1977).
- ¹²T. Rios, A. Romo de Vivar und J. Romo, *Tetrahedron* 23, 4265 (1967).
- ¹³Z. Samek, *Ibid.* 9, 671 (1970).
- ¹⁴W. Herz, P. S. Subramaniam und N. Dennis, *J. Org. Chem.* 34, 2915 (1969).
- ¹⁵M. Yanagita, S. Inayama und T. Kawamata, *Tetrahedron Letters* 2, 131 (1970).
- ¹⁶G. Willuhn und H.-D. Herrmann, *Pharm. Ztg.* 123, 1803 (1978).