

- [8] R.B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 72; L.F. Fieser, 'Natural Products Related to Phenanthrene', 2nd edn., Reinhard, 1937, p. 398.
- [9] H. Huber, personal communication (Institute of Physical Chemistry, University of Basel).
- [10] K. Hafner, F. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 5105.
- [11] Pentadienyl cations of type **4** have also been generated by protonation of 1,3-di-*tert*-butyl-6-chloro-pentafulvene: K. Hafner, B. Stowasser, H.-P. Krimmer, S. Fischer, M.C. Böhm, H.J. Lindner, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 646.
- [12] B. Tieke, S.A. Zahir, US Pat. 1989, 4840999; S.A. Zahir, personal communication.
- [13] For detailed experimental procedures, analytical and spectroscopic data as well as for reproductions of spectra see [14]. Procedures of the reactions **1b** → **7b** and **6** → **8** → **9** as well as spectroscopic data will be published in a full paper.
- [14] G. Zhang, Ph. D. thesis, University of Bern, 1993.
- [15] Corresponding to the average formula  $C_8H_{9,2}I_{0,66}$ .

*Chimia* 48 (1994) 564–569  
© Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft  
ISSN 0009-4293

## Isolierung, HPLC-Trennung und Quantifizierung der Sesquiterpenfraktion von *Petasites hybridus* (L.) G. M. et SCH. [1]

Bertold Debrunner [2] und Markus Neuenschwander\*

**Abstract.** A simple and easily reproducible HPLC procedure allows to separate total extracts of *Petasites hybridus* (L.) G. M. et SCH. and to detect numerous sesquiterpenes (in most cases sesquiterpene esters) of the general formula **1** (isopetasols), **2** (neopetasols), **3** (petasols), **4** (13-substituted isopetasols), and **5** (13-substituted neopetasols). Four so far unknown sesquiterpene esters **2f** (neo-S-petasin), **2g** ((*E*)-3-(methylthio)acryloyl-neopetasol), **3g** ((*E*)-3-(methylthio)acryloyl-petasol), and **5b** (3-desoxy-13-(angeloyloxy)-neopetasol) have been isolated and the contents of the pharmacologically most interesting compounds isopetasin (**1b**), neopetasin (**2b**), and petasin (**3b**), have been quantitatively determined. Additionally two of the basic alcohols petasol and isopetasol have been detected for the first time in small amounts in roots of *P. hybridus*.

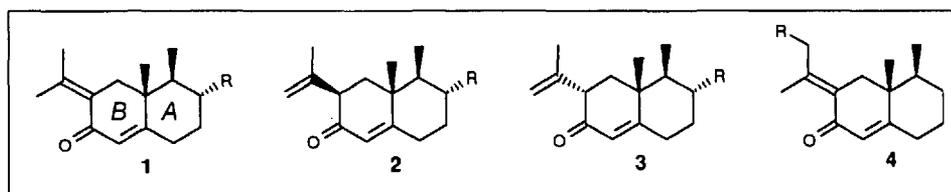
### 1. Einleitung

*Petasites hybridus* (L.) G. M. et SCH. (Familie: Compositae) ist eine ausdauernde, häufig in dichten Beständen auftretende Pflanze mit kräftigem Wurzelstock und meterlangen Ausläufern. Sie stellt in Europa die am weitesten verbreitete Art der Gattung *Petasites* MILLER dar und wächst im Flachland und seltener im Gebirge auf sickernassen, zeitweise überfluteten, nährstoffreichen, tonigen Böden an Bach- und Flussufern. Bereits im 1. Jahrhundert n. Chr. wurde die gemeine Pestwurz von

*Pedanius Dioskurides*, dem Legionärsarzt unter *Claudius* und *Nero*, in seinem Werk 'De materia medica', welches bis ins 17. Jh. als unumstössliche Grundlage der Arzneimittellehre und Botanik galt, als Heilpflanze erwähnt. Der pharmakologische Nachweis der antispastischen Wirkung [3] erfolgte mit einem methanolischen Rohextrakt aus frisch gegrabenen *P. hybridus*-Wurzeln am isolierten Meerschweinchendarm. Daraus ergaben sich die neuzeitlichen Anwendungsgebiete, welche sowohl die spasmolytische Wirkung als auch eine analgetische Wirkung des Pflanzenextrak-

tes mit einem spezifischen Effekt im Sinne eines Tranquilizers ausnutzen. Heute werden die Pflanzendroge und ihre Zubereitungen zunehmend als 'Spasmo-Analgetikum mit beruhigender und vegetativ regulierender Wirkung' eingesetzt. Die biologische Aktivität von Inhaltsstoffen aus volksmedizinisch verwendeten Pflanzen ist ein wichtiges Bindeglied zwischen Chemie und Medizin, und die Suche nach aktiven Verbindungen ist auch heutzutage aktuell. So zeigen neueste Untersuchungen zur Antitumor-Wirkung des *P. hybridus*-Gesamtextraktes eine *in vitro* antiproliferative Wirkung für humane T24-Blasenkarzinom-Zellen bei einer Verdünnung von 1:200 000 ( $\cong 5 \mu\text{g/ml}$ ). Die  $IC_{50}$ -Werte ( $\cong 50\%$  Wachstumshemmung) der Petasin- bzw. S-Petasin-Zone lagen bei 0,17 resp. 0,12  $\mu\text{g/ml}$  [4]. Bekannte als Antitumor-Mittel in Frage kommende Substanzen weisen ähnliche Werte auf.

Bei den ersten phytochemischen Untersuchungen [5–9] konnten vier Verbindungen (Isopetasin (**1b**), Iso-S-petasin (**1f**), Petasin (**3b**), S-Petasin (**3f**)) des Eremophilantyps isoliert und in ihrer Struktur bis auf sterische Details aufgeklärt werden. Als aktivstes und genuines antispastisches Prinzip von *P. hybridus* wurde Petasin (**3b**) erkannt. Später gelang es [10][11], 16 Sesquiterpen-Inhaltsstoffe zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären, die sich in drei Hauptgruppen einteilen lassen: Isopetasol- (**1**), Neopetasol- (**2**) und Petasol-Gruppe (**3**), welche sich voneinander durch Isomerie im Ring *B* des Decalin-Gerüsts unterscheiden. Ring *B* liegt bei der Petasol- und Isopetasol-Gruppe als Sessel, im Falle der Neopetasol-Gruppe dagegen als Wanne vor. Ring *A* nimmt überall die Sessel-Form ein. Von einer vierten Gruppe konnte nur ein Vertreter gefunden wer-



\*Korrespondenz: Prof. Dr. M. Neuenschwander  
Institut für organische Chemie  
Universität Bern  
Freiestrasse 3  
CH-3012 Bern

- [8] R.B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 72; L.F. Fieser, 'Natural Products Related to Phenanthrene', 2nd edn., Reinhard, 1937, p. 398.
- [9] H. Huber, personal communication (Institute of Physical Chemistry, University of Basel).
- [10] K. Hafner, F. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 5105.
- [11] Pentadienyl cations of type **4** have also been generated by protonation of 1,3-di-*tert*-butyl-6-chloro-pentafulvene: K. Hafner, B. Stowasser, H.-P. Krimmer, S. Fischer, M.C. Böhm, H.J. Lindner, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 646.
- [12] B. Tieke, S.A. Zahir, US Pat. 1989, 4840999; S.A. Zahir, personal communication.
- [13] For detailed experimental procedures, analytical and spectroscopic data as well as for reproductions of spectra see [14]. Procedures of the reactions **1b** → **7b** and **6** → **8** → **9** as well as spectroscopic data will be published in a full paper.
- [14] G. Zhang, Ph. D. thesis, University of Bern, 1993.
- [15] Corresponding to the average formula  $C_8H_{9,2}I_{0,66}$ .

Chimia 48 (1994) 564–569  
© Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft  
ISSN 0009-4293

## Isolierung, HPLC-Trennung und Quantifizierung der Sesquiterpenfraktion von *Petasites hybridus* (L.) G. M. et SCH. [1]

Bertold Debrunner [2] und Markus Neuenschwander\*

**Abstract.** A simple and easily reproducible HPLC procedure allows to separate total extracts of *Petasites hybridus* (L.) G. M. et SCH. and to detect numerous sesquiterpenes (in most cases sesquiterpene esters) of the general formula **1** (isopetasols), **2** (neopetasols), **3** (petasols), **4** (13-substituted isopetasols), and **5** (13-substituted neopetasols). Four so far unknown sesquiterpene esters **2f** (neo-S-petasin), **2g** ((*E*)-3-(methylthio)acryloyl-neopetasol), **3g** ((*E*)-3-(methylthio)acryloyl-petasol), and **5b** (3-desoxy-13-(angeloyloxy)-neopetasol) have been isolated and the contents of the pharmacologically most interesting compounds isopetasin (**1b**), neopetasin (**2b**), and petasin (**3b**), have been quantitatively determined. Additionally two of the basic alcohols petasol and isopetasol have been detected for the first time in small amounts in roots of *P. hybridus*.

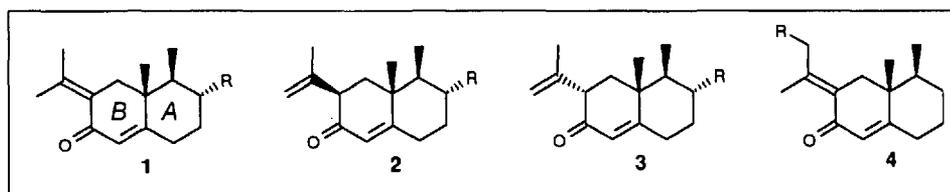
### 1. Einleitung

*Petasites hybridus* (L.) G. M. et SCH. (Familie: Compositae) ist eine ausdauernde, häufig in dichten Beständen auftretende Pflanze mit kräftigem Wurzelstock und meterlangen Ausläufern. Sie stellt in Europa die am weitesten verbreitete Art der Gattung *Petasites* MILLER dar und wächst im Flachland und seltener im Gebirge auf sickernassen, zeitweise überfluteten, nährstoffreichen, tonigen Böden an Bach- und Flussufern. Bereits im 1. Jahrhundert n. Chr. wurde die gemeine Pestwurz von

*Pedanius Dioskurides*, dem Legionärsarzt unter *Claudius* und *Nero*, in seinem Werk 'De materia medica', welches bis ins 17. Jh. als unumstössliche Grundlage der Arzneimittellehre und Botanik galt, als Heilpflanze erwähnt. Der pharmakologische Nachweis der antispastischen Wirkung [3] erfolgte mit einem methanolischen Rohextrakt aus frisch gegrabenen *P. hybridus*-Wurzeln am isolierten Meerschweinchendarm. Daraus ergaben sich die neuzeitlichen Anwendungsgebiete, welche sowohl die spasmolytische Wirkung als auch eine analgetische Wirkung des Pflanzenextrak-

tes mit einem spezifischen Effekt im Sinne eines Tranquilizers ausnutzen. Heute werden die Pflanzendroge und ihre Zubereitungen zunehmend als 'Spasmo-Analgetikum mit beruhigender und vegetativ regulierender Wirkung' eingesetzt. Die biologische Aktivität von Inhaltsstoffen aus volksmedizinisch verwendeten Pflanzen ist ein wichtiges Bindeglied zwischen Chemie und Medizin, und die Suche nach aktiven Verbindungen ist auch heutzutage aktuell. So zeigen neueste Untersuchungen zur Antitumor-Wirkung des *P. hybridus*-Gesamtextraktes eine *in vitro* antiproliferative Wirkung für humane T24-Blasenkarzinom-Zellen bei einer Verdünnung von 1:200 000 ( $\cong$  5 µg/ml). Die  $IC_{50}$ -Werte ( $\cong$  50% Wachstumshemmung) der Petasin- bzw. S-Petasin-Zone lagen bei 0,17 resp. 0,12 µg/ml [4]. Bekannte als Antitumor-Mittel in Frage kommende Substanzen weisen ähnliche Werte auf.

Bei den ersten phytochemischen Untersuchungen [5–9] konnten vier Verbindungen (Isopetasin (**1b**), Iso-S-petasin (**1f**), Petasin (**3b**), S-Petasin (**3f**)) des Eremophilantyps isoliert und in ihrer Struktur bis auf sterische Details aufgeklärt werden. Als aktivstes und genuines antispastisches Prinzip von *P. hybridus* wurde Petasin (**3b**) erkannt. Später gelang es [10][11], 16 Sesquiterpen-Inhaltsstoffe zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären, die sich in drei Hauptgruppen einteilen lassen: Isopetasol- (**1**), Neopetasol- (**2**) und Petasol-Gruppe (**3**), welche sich voneinander durch Isomerie im Ring *B* des Decalin-Gerüsts unterscheiden. Ring *B* liegt bei der Petasol- und Isopetasol-Gruppe als Sessel, im Falle der Neopetasol-Gruppe dagegen als Wanne vor. Ring *A* nimmt überall die Sessel-Form ein. Von einer vierten Gruppe konnte nur ein Vertreter gefunden wer-



\*Korrespondenz: Prof. Dr. M. Neuenschwander  
Institut für organische Chemie  
Universität Bern  
Freiestrasse 3  
CH-3012 Bern

den, welcher die Angelicasäure an der (Z)-ständigen Me-Gruppe der exocyclischen (C=C)-Bindung des Rings B trägt (4).

In Weiterführung der phytochemischen Arbeiten war eine rasche und schonende flüssigchromatographische Methode zur Isolierung der Sesquiterpenester und eine problemlos reproduzierbare Normalphasen-HPLC-Methode zur Trennung eines *P. hybridus*-Gesamtextraktes wünschenswert. Im folgenden berichten wir über die Entwicklung einer analytischen Extraktions- und HPLC-Trennmethode sowie die Quantifizierung der Petasin-Isomeren. Damit sollen Grundlagen geschaffen werden, mit geringem Zeitaufwand Analysen an Einzelpflanzen innerhalb einer Pestwurz-Population durchzuführen [12]. Diese einfache und generell anwendbare Methode kann als Standardisierungsverfahren in der Pestwurzanalytik eingesetzt werden.

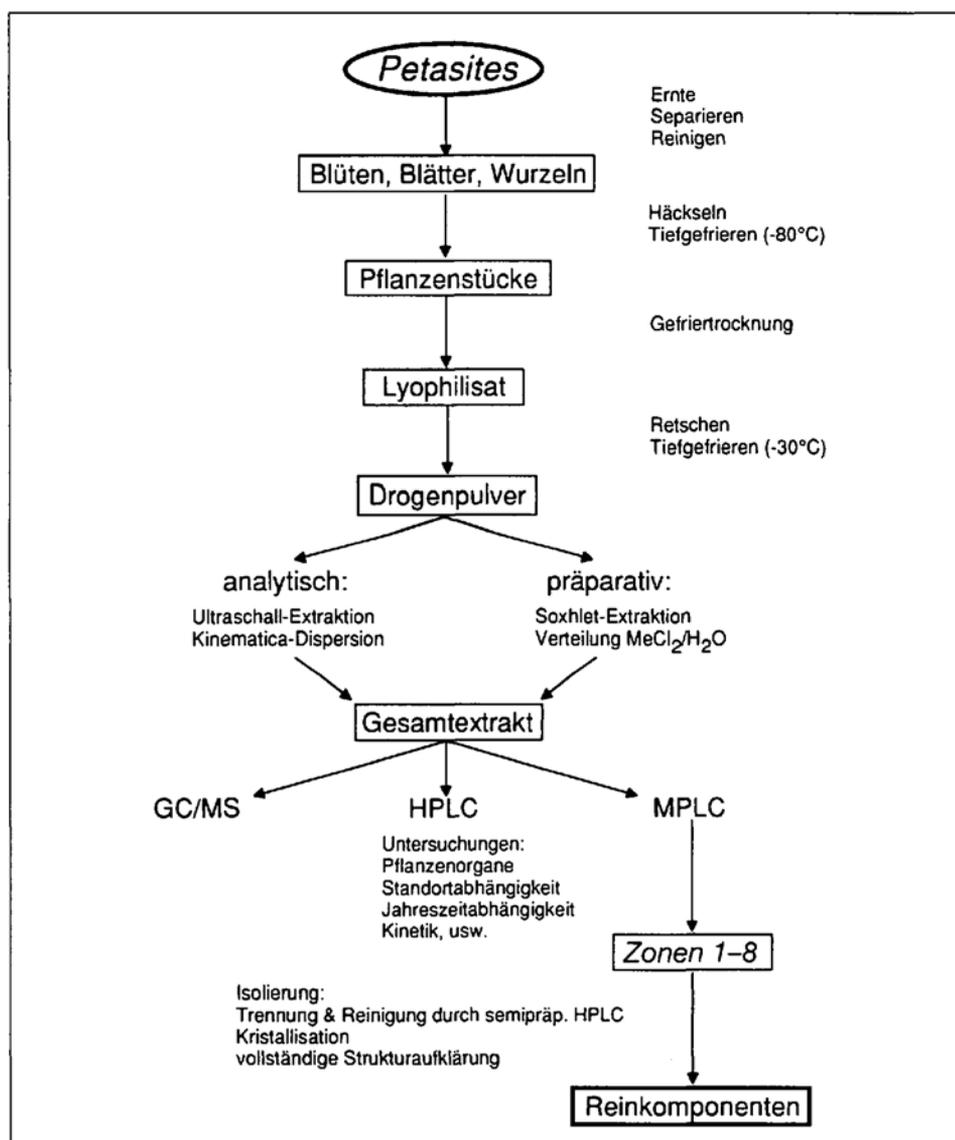
**2. Resultate und Diskussion**

**2.1. Trennung und Isolierung der Inhaltstoffe von *P. hybridus***

Um Referenzverbindungen für die im folgenden beschriebenen qualitativen und quantitativen HPLC-Untersuchungen zu erhalten, war es unumgänglich, die Hauptkomponenten aus der Sesquiterpenfraktion von *P. hybridus*-Wurzeln zu isolieren. Aus 100 g gefriergetrocknetem Wurzelpulver liessen sich mit einer Soxhlet-Extraktion unter vermindertem Druck und anschliessender CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O-Verteilung 2.5 g eines dunkeln, viskosen Gesamtextraktes gewinnen. Nach einer MPLC-Vortrennung des Gesamtextrakts an Kieselgel in acht Zonen (vgl. Tab. 1) wurden die sesquiterpenhaltigen Zonen 3, 5 und 7 mittels HPLC weiter aufgetrennt.

Aus Zone 3 konnten 3-Desoxy-neopetasol (2a) und 3-Desoxy-13-(angeloyloxy)-isopetasol (4b) isoliert werden, während aus Zone 5 Isopetasin (1b), Neopetasin (2b), Isobutyryl-neopetasol (2e), Petasin (3b), 3-Methyl-crotonyl-petasol (3c), Methacryloyl-petasol (3d) sowie 3-Desoxy-13-(angeloyloxy)-neopetasol (5b) und aus Zone 7 Iso-S-petasin (1f), Neo-S-petasin (2f), (E)-3-(Methylthio)-acryloyl-neopetasol (2g), S-Petasin (3f) sowie (E)-3-(Methylthio)-acryloyl-petasol (3g) isoliert wurden (vgl. Tab. 2).

Insgesamt ergab die semipräparative Normalphasen- und 'reversed phase'-HPLC 14 Sesquiterpene als reine Einzelkomponenten, wobei zehn Verbindungen schon früher beschrieben worden sind [10][11] (Tab. 2). Sämtliche isolierten Komponenten wurden in der Folge zur Strukturermittlung unter Anwendung kom-



Tab. 1. MPLC-Trennung des Wurzel-Gesamtextraktes von *P. hybridus* in acht Zonen<sup>a)</sup>

Zone	Anteil [%]	Inhaltstoffe
1	8,5	Carotinoide, Triglyceride
2	6	Triglyceride
3	2	2 Komponenten (2a und 4b)
4	0,5	Mischfraktion von Zonen 3 und 5
5	48	Petasin-Zone (7 Komponenten)
6	9	β-Sito- und Stigmasterin
7	13	S-Petasin-Zone (5 Komponenten)
8	13	polarer Rest

<sup>a)</sup> Gewichtsprozente der Zonen bez. Gesamtextrakt.

binierter spektroskopischer Methoden herangezogen. Über die spektroskopischen Ergebnisse wird an anderer Stelle berichtet werden [13].

**2.2. HPLC-Identifizierung der Sesquiterpenester**

Aufgrund der DC-Erfahrungen war zu erwarten, dass ein adsorptionschromatographisches Trennsystem gute Vorausset-

zungen zur schnellen Trennung des Gesamtextraktes bieten würde. Wegen der unterschiedlichen Polarität der Inhaltstoffe schien eine Gradientenmethode wesentlich geeigneter zu sein als ein isokratisches Verfahren. Nach zahlreichen Versuchen mit verschiedenen mobilen und stationären Phasen (CN, Phenyl, C<sub>18</sub>, Chromsil), stellte sich heraus, dass eine HPLC-Trennung auf einer Nucleosil 100-

3 Säule (250 x 4 mm) mit einem Hexan/(i-Pr)<sub>2</sub>O/MeCN-Gradienten die besten Ergebnisse zeigte. Die qualitative HPLC-Analyse wurde auf eine Basislinientrennung der drei Isomeren von Petasin (3b) und S-Petasin (3f) optimiert, da eine gute

Auflösung von Iso- (1b), Neo- (2b) und Petasin (3b) die Voraussetzung für die quantitative Analyse darstellte.

Die analytische HPLC und die Auswertung der Trennung mit dem UV/VIS Photo-Dioden-Array (PDA) erlaubten

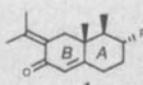
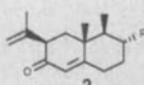
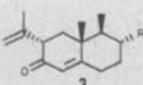
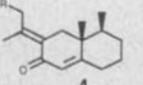
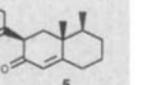
Aussagen qualitativer und quantitativer Natur. Die Einheitlichkeit einer eluierten Komponente konnte durch Vergleich der UV-Spektren vom Anfang, Mitte und Ende des Peaks überprüft werden.

Aufgabe der qualitativen Analyse war es schliesslich, die Peaks des Chromatogramms (Fig. 1) anhand eines Vergleichs ihrer Retentionszeiten mit Referenzverbindungen zu identifizieren (vgl. Tab. 3) und eine Reinheitskontrolle für deren Quantifizierung zu haben.

Ein typisches HPLC-Chromatogramm eines Wurzelextrakts von *P. hybridus* ist in Fig. 1 wiedergegeben, welches zeigt, dass nebst den sechs Hauptkomponenten Isopetasin (1b), Neopetasin (2b), Petasin (3b) und Iso-S-petasin (1f), Neo-S-petasin (2f) und S-Petasin (3f) auch zahlreiche weitere Sesquiterpenester sauber getrennt und nachgewiesen werden können. Hauptvorteile des Verfahrens sind eine gute und reproduzierbare Trennleistung bei relativ bescheidenem Zeitaufwand (inkl. Extraktion ca. 1.5 h).

Fig. 1 zeigt eine beachtenswerte Beziehung zwischen chemischer Struktur und chromatographischem Verhalten der Sesquiterpenester, indem die Iso- immer kurz vor den Neo-Verbindungen und letztere mit einem Abstand von ca. 3 min vor den Petasin-Derivaten eluiert werden, was eine selektive Trennung ermöglicht.

Tab. 2. Zusammenstellung aller aus *P. hybridus* (Petasin-Chemovarietät) isolierten Sesquiterpenester<sup>a)</sup>

Rest R					
H	1a = A	2a = B <sup>b)</sup>			
	1b = D <sub>1</sub> <sup>b)</sup>	2b = D <sub>2</sub> <sup>b)</sup>	3b = E <sub>1</sub> <sup>b)</sup>	4b = C <sup>b)</sup>	5b <sup>b)</sup>
	1c = D <sub>3</sub>	2c = D <sub>6</sub>	3c = E <sub>2</sub> <sup>b)</sup>		
	1d = D <sub>4</sub>	2d = D <sub>7</sub>	3d = E <sub>3</sub> <sup>b)</sup>		
	1e = D <sub>5</sub>	2e = D <sub>8</sub> <sup>b)</sup>			
	1f = F <sub>1</sub> <sup>b)</sup>	2f <sup>b)</sup>	3f = F <sub>2</sub> <sup>b)</sup>		
	1g	2g <sup>b)</sup>	3g <sup>b)</sup>		

<sup>a)</sup> Grossbuchstaben: Nomenklatur nach A. Neuenschwander [10][11].

<sup>b)</sup> In dieser Arbeit isolierte Verbindungen.

Tab. 3. Vergleich der Retentionszeiten von Referenzverbindungen mit denen eines Gesamt-Wurzelextraktes von *P. hybridus*

Referenzsubstanz	Retentionszeit		Differenz	
	Referenz		Wurzelextrakt	
	t <sub>R</sub> [min]	UV <sub>max</sub>	t <sub>R</sub> [min]	Δt <sub>R</sub> [min]
3-Desoxy-neopetasol (2a)	8,35	234,8	8,44	+0,09
3-Desoxy-13-(angeloyloxy)-isopetasol (4b)	9,50	232,9; 246	–	–
Isopetasin (1b)	13,48	231; 269	13,32	–0,16
Neopetasin (2b)	14,25	232,9	14,05	–0,20
3-Methyl-crotonyl-isopetasol (1c)	14,79	231; 267	–	–
3-Desoxy-13-(angeloyloxy)-neopetasol (5b)	15,08	231	14,90	–0,18
Isobutyryl-isopetasol (1e)	15,37	238,6; 269	–	–
Methacryloyl-isopetasol (1d)	15,39	238,6; 269	–	–
Isobutyryl-neopetasol (2e)	16,09	232,9	15,61	–0,48
Petasin (3b)	17,82	234,8	17,45	–0,37
3-Methyl-crotonyl-petasol (3c)	19,24	234,8	19,35	+0,11
Methacryloyl-petasol (3d)	19,81	232,9	20,21	+0,40
β-Sitosterin/Stigmasterin	21,97	< 231	22,30	+0,33
(E)-3-(Methylthio)-acryloyl-isopetasol (1g)	27,79	231; 269	–	–
(E)-3-(Methylthio)-acryloyl-neopetasol (2g)	28,39	231; 269	28,46	+0,07
(E)-3-(Methylthio)-acryloyl-petasol (3g)	31,44	232,9; 269	31,41	–0,03
Iso-S-petasin (1f)	31,74	233; 280,4	31,82	+0,08
Neo-S-petasin (2f)	32,37	233; 284,2	32,39	+0,02
S-Petasin (3f)	33,96	233; 284,2	33,89	–0,07

$t_R(\text{Isopetasyl-}) < t_R(\text{Neopetasyl-}) < t_R(\text{Petasylester})$ .

Sechs Verbindungen des Isopetasylester-Typs (**1a**, **1c–e**, **1g** und **4b**) konnten im Vergleich zu früheren Arbeiten [10][14] im Wurzelextrakt (Gurnigel, 7. April 1993) nicht nachgewiesen werden. Da die Isopetasin-Derivate die thermodynamisch stabilsten Verbindungen darstellen, wäre zu vermuten, dass sich diese sechs Komponenten erst bei der Lagerung des Pflanzenmaterials bilden und/oder genuin nur in Spuren vorkommen [15].

Zum ersten Mal konnten in einem *P. hybridus*-Wurzelextrakt auch die beiden Alkohole Isopetasol und Petasol im Vergleich mit Referenzverbindungen identifiziert werden (vgl. Fig. 2). Beide Inhaltsstoffe liegen nur in kleiner Konzentration vor und wurden unter isokratischen HPLC-Bedingungen auf einer 250/8/4 *Nucleosil 100-3* Säule eluiert und getrennt.

### 2.3. Quantifizierung von Petasin, Isopetasin und Neopetasin

Ziel der quantitativen Arbeiten war, die Konzentrationen bzw. Mengen der drei pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe Isopetasin (**1b**), Neopetasin (**2b**) und Petasin (**3b**) in den Pflanzenextrakten zu bestimmen. Es sollte dabei eine einfache und schnelle Methode erarbeitet werden, welche die Standardisierung von Phytopharmaka zur Sicherstellung einer gleichbleibenden Qualität ermöglicht. Zur quantitativen Analyse bediente man sich der Peakflächen-Eichung mit Hilfe der externen Standardmethode. Dazu wurden Eichlösungen der Referenzverbindungen mit abgestufter Konzentration hergestellt und chromatographiert (Injektionsvolumen 10  $\mu$ l). Die Eichgeraden (vgl. Fig. 3) wurden erhalten, indem die Peakfläche gegen die Konzentration aufgetragen wurde. Die Konzentration bzw. die Menge einer unbekannt Probe liess sich aus der vom PDA-Integrator ermittelten Fläche über die Eichkurve berechnen. Bei allen Komponenten konnten gute Korrelationskoeffizienten für die Regressionsgeraden berechnet und somit die Linearität des Detektors im interessierenden Konzentrationsbereich bestätigt werden.

Aus den in Fig. 3 aufgeführten Eichwerten folgt nicht nur die Linearität der Eichgeraden. Es zeigt sich auch, dass Isopetasin (**1b**), Neopetasin (**2b**) und Petasin (**3b**) bei 254 nm eine sehr unterschiedliche Empfindlichkeit aufweisen. Zur Erzeugung einer Peakfläche von 0,1 AU·min werden rund 6  $\mu$ g/10  $\mu$ l Isopetasin (**1b**), 25  $\mu$ g/10  $\mu$ l Neopetasin (**2b**) und 46  $\mu$ g/10  $\mu$ l Petasin (**3b**) benötigt. Daraus folgt, dass

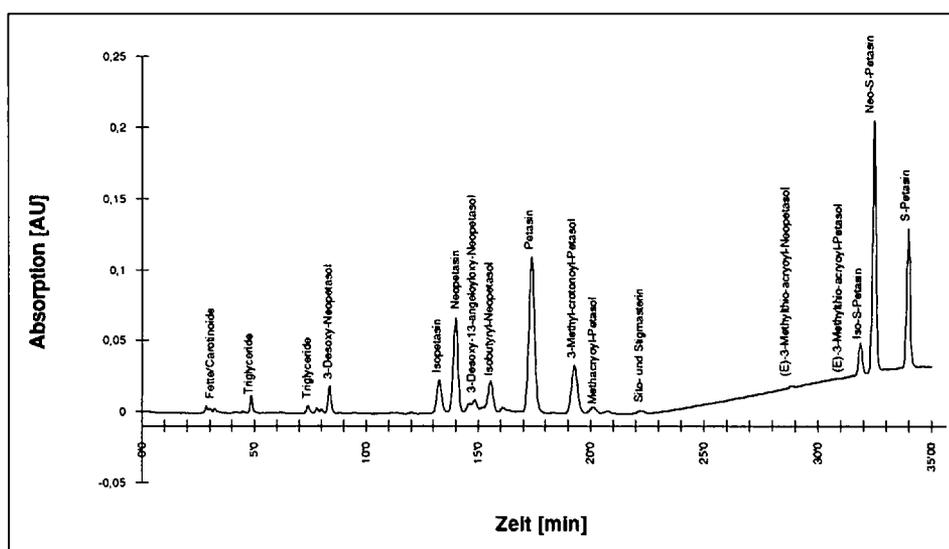


Fig. 1. Analytische HPLC-Gradiententrennung von 10  $\mu$ l eines Wurzel-Gesamtexttraktes von *P. hybridus* (Standort: Gurnigel; Säule: 250/8/4 *Nucleosil 100-3*; Detektion: PDA (254 nm); Gradient: Hexan/(i-Pr)<sub>2</sub>O/MeCN)

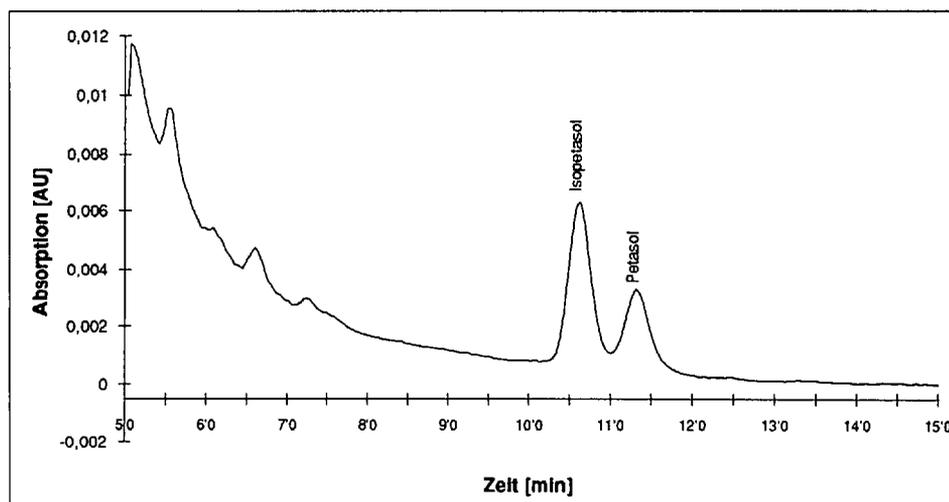


Fig. 2. Isokratische HPLC-Trennung von Isopetasol und Petasol in einem Wurzel-Gesamtexttrakt von *P. hybridus* (Standort: Gurnigel; Säule: 250/8/4 *Nucleosil 100-3*; LM: Hexan/i-PrOH 9:1; Detektion: PDA (254 nm))

der UV-Detektor bei 254 nm auf Isopetasin (**1b**) rund achtmal empfindlicher und auf Neopetasin (**2b**) rund zweimal empfindlicher anspricht als auf Petasin (**3b**). Interessant ist auch, dass die unterschiedlichen Konformationen von Neopetasin (**2b**) und Petasin (**3b**) das UV-Absorptionsverhalten deutlich beeinflussen.

Nach durchgeführter Quantifizierung lässt sich der Gehalt der Hauptinhaltsstoffe Isopetasin (**1b**), Neopetasin (**2b**) und Petasin (**3b**) direkt aus HPLC-Chromatogrammen ermitteln. So folgen z.B. aus dem Chromatogramm des Wurzelextraktes von Fig. 1 die Gehalte der Tab. 4.

### 3. Zusammenfassung

Es ist gelungen, eine einfache und leicht reproduzierbare Normalphasen-HPLC-Methode zur Trennung eines *P. hybridus*-

Gesamtexttraktes zu entwickeln und eine Reihe von Sesquiterpenen (Tab. 2) zu isolieren. Insbesondere sind vier in der Literatur bisher nicht beschriebene Naturstoffe Neo-S-petasin (**2f**), (E)-3-(Methylthio)acryloyl-neopetasol (**2g**), (E)-3-(Methylthio)acryloyl-petasol (**3g**) und 3-Desoxy-13-(angeloyloxy)-neopetasol (**5b**) isoliert worden. Ferner konnten die pharmakologisch interessierenden Inhaltsstoffe Isopetasin (**1b**), Neopetasin (**2b**) und Petasin (**3b**) quantifiziert werden. Zwei der zugrunde liegenden Alkohole – Petasol und Isopetasol – liessen sich zum ersten Mal in Pestwurz-Wurzeln nachweisen.

### 4. Experimentelles

#### 4.1. Allgemeines

Sämtliche Operationen wurden unter N<sub>2</sub> und Lichtausschluss durchgeführt. Die verwendeten Lsgm. (*Romil*) waren von HPLC-Qualität und

wurden zum Entfernen von Schwebeteilchen durch Glas-Microfibre-Filter GF/F (Whatman, Maidstone, GB, Ø 2,5 cm) gefiltert. Das Einengen der Lsgm. i. RV. erfolgte schonend bei max. 25°.

MPLC: MPLC-Trennungen erfolgten auf dem System B-680 von Büchi bestehend aus einer

Pumpe B-681 mit 6-Weg-Umstellhahn und 20 ml Probenschleife. Säule: B-685 (Dimensionen 49 x 460 mm) mit Vorsäule sowie Set zum Trockenfüllen der Säule. Fraktionensammler: B-684 und 4 Racks mit 120 Gläsern zu 50 ml. UV-Filterphotometer: mit 220 und 254 nm Festfilter und Digitalanzeige. Peakdetektor: B-686. Schreiber: I-

Kanal Linienschreiber (Knaur). Kieselgel: Flashgel (40–60 µm; Baker), Kieselgel C 560 (15–35 µm; CFU) oder Lichroprep (15–25 µm; Merck).

HPLC: HPLC-Analysen erfolgten auf einem Waters-991 Photodiodenarray-Gerät mit NEC Powermate SX Computer mit Waters-5200 Plotter. Das Kontron-Pumpensystem bestand aus zwei 414 T Pumpen mit einem C 457-T HPLC-Controller und einem 802 Mixer. Injektor: Rheodyne RE 7125 mit 20- oder 100 µl Probenschleifen. Für anal. Normalphasen-Trennungen wurde eine Nucleosil 100-3 Säule (Dimensionen 250/8/4 mm; Macherey-Nagel) mit einer eingebauten Nucleosil 100-5 Vorsäule (Dimensionen 11/6/4 mm) verwendet. Semipräp. Säulen: 5 µm R Sil Silica D (250 x 10 mm i.d.), 5 µm Ro Sil CN (250 x 10 mm i.d.; beide von Bio Rad), 7 µm Nucleosil C18 (250 x 10 mm i.d.; Macherey-Nagel). Die Trennungen erfolgten bei RT. Die Proben wurden jeweils im Eluenten gelöst und mit einem Alltech HPLC-Spritzenfilter (Serie 6000; 0,45 µm; Nylon 66) vor der Probeninjektion filtriert. Die Entgasung der Laufmittel geschah mit Hilfe von Ultraschall.

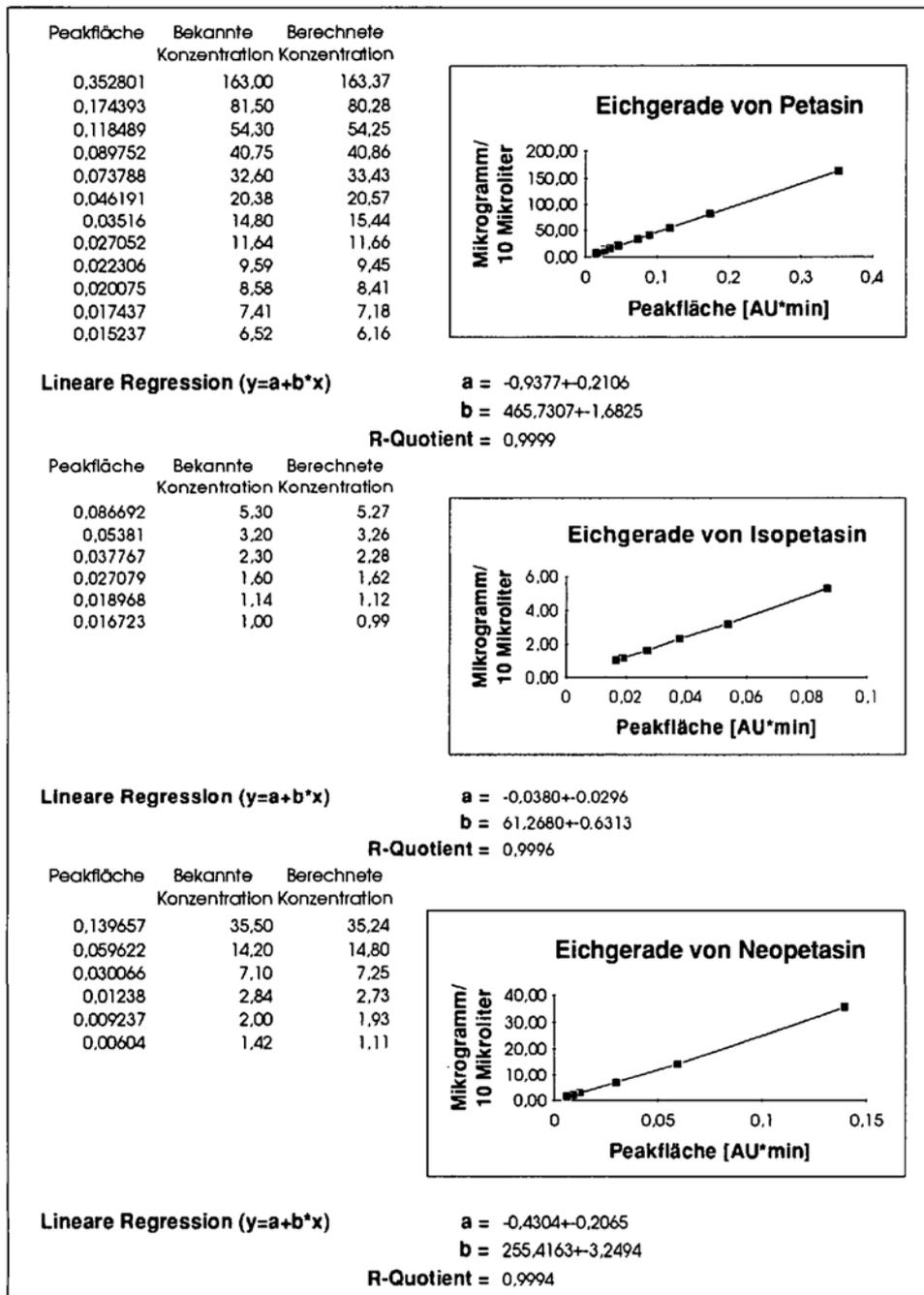


Fig. 3. Eichgeraden von Petasin, Isopetasin und Neopetasin (Säule: 250/8/4 Nucleosil 100-3; LM: A: Hexan, B: (i-Pr)<sub>2</sub>O/MeCN (9:1, v/v), 14,75% B in A+B; Detektion: PDA (254 nm))

Tab. 4. Gewichtsanteile von Petasin, Isopetasin und Neopetasin am Gesamt-Wurzelextrakt und auf das Wurzel-Trockengewicht bezogen (Standort: Gurnigel; Ernte: 8. Aug. 1993; Quantifizierung: externe Standardmethode)

Komponente	Anteil am Gesamtextrakt [%]	Anteil pro g getrockneter Wurzel [µg]
Petasin (3b)	33,8	7607
Isopetasin (1b)	0,7	164
Neopetasin (2b)	8,8	1991
Summe	43,3	9762

4.2. Pflanzenmaterial

P. hybridus-Wurzeln wurden am Dürrbach/Gurnigel am 8. August 1993 gesammelt. Die Wurzeln wurden unmittelbar nach der Ernte gewaschen, mit einem Gartenhäcksler (Viking Spezial AD 351) in ca. 2 cm grosse Stücke zerkleinert, auf -80° tiefgefroren, gefriergetrocknet und mit einer Ultra-Zentrifugalmühle nach RETSCH (Ringsieburchmesser 1 mm) pulverisiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das unter N<sub>2</sub> in braune Pulverflaschen abgefüllte hellbraune Wurzelpulver im Tiefkühlfach bei -30° gelagert. Das Trockengewicht des Pflanzenpulvers entsprach ca. 25% des Frischgewichts.

4.3. Präp. Extraktion und Vorreinigung (vgl. Isolierschema)

Je 100 g der gefriergetrockneten Droge wurden 12 h bei 25° unter leicht vermindertem Druck (ca. 600 mbar) mit 1,3 l CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> erschöpfend extrahiert (Soxhlet). Zur Abtrennung polarer Verbindungen erfolgte eine wässr. Verteilung, wobei der gelbe CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakt nach Einengung auf die Hälfte des Volumens 5x mit 150 ml H<sub>2</sub>O dest. gewaschen wurde. Zugabe von wenig NaCl verbesserte die Phasentrennung. Die org. Phase wurde getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und durch eine G3-Glasfilternutsche sowie über Celite filtriert. Der Rohextrakt wurde im RV. bei 25° eingengt und bei < 10<sup>-3</sup> Torr vollständig getrocknet. Der dunkle viskose Rückstand (2,5 g) wurde bis zur anschließenden MPLC-Trennung unter Lichtabschluss und N<sub>2</sub> bei 4° aufbewahrt.

4.4. Trennung der Zonen (Tab. 1) durch MPLC

Der Gesamtextrakt (2,5 g) liess sich mit dem MPLC-System B-680 von Büchi auf einer 49 x 460 mm Glassäule an 40–60 µm Flash-Kieselgel (Baker) mit Hexan/AcOEt 85:15 bei einem Fluss von 27 ml/min und einem Druck von 4 bar in 8 Zonen auftrennen [16]. Die Detektion geschah mit einem UV-Filterphotometer mit Durchflusszelle bei 254 nm, die Fraktionierung automatisch mit einem mikroprozessorgesteuerten Peakdetektor und einem Fraktionensammler.

Tab. 5. Bei der semipräparativen HPLC verwendete Laufmittelsysteme (LM) und Säulenmaterialien

LM	A	B	Gemisch	Fluss	Typ
LM1	Hexan	<i>t</i> -BuOMe	10% B in A+B	5 ml/min	R Sil Silica D
LM2	Hexan	AcOEt	6,3% B in A+B	6,1 ml/min	R Sil Silica D
LM3	Hexan	<i>t</i> -BuOMe/MeCN 9:1	5% B in A+B	6 ml/min	Ro Sil CN
LM4	Hexan	15% AcOEt Hexan	72% B in A+B	4,2 ml/min	R Sil Silica D
LM5	H <sub>2</sub> O	MeOH/MeCN 1:1	75% B in A+B	6 ml/min	Nucleosil C <sub>18</sub>
LM6	Cyclohexan	<i>t</i> -BuOMe	8% B in A+B	5 ml/min	R Sil Silica D
LM7	Cyclohexan	<i>t</i> -BuOMe/MeCN 9:1	8% B in A+B	5 ml/min	R Sil Silica D
LM8	Cyclohexan	<i>t</i> -BuOMe/MeCN 9:1	10% B in A+B	5 ml/min	R Sil Silica D
LM9	Hexan	<i>t</i> -BuOMe/MeCN 9:1	14% B in A+B	6,1 ml/min	Ro Sil CN

#### 4.5. Isolierung der Reinkomponenten (Tab. 2) durch semipräp. HPLC [17]

Die semipräp. Trennung der Zone 3 geschah mit dem Laufmittelsystem LM1 (vgl. Tab. 5). Die Retentionszeit von **2a** betrug 9,4 min, diejenige von **4b** 11,8 min, wobei eine Grundlinientrennung gelang und beide Komponenten einzeln aufgefangen werden konnten.

Die Trennung der komplexen Zone 5 in sechs Fraktionen (Fraktionen 5.1–5.6, [18]) erfolgte mit LM2 (vgl. Tab. 5), aber ohne Basislinientrennung. Zur weiteren Trennung wurden andere Laufmittelsysteme verwendet. Die beiden Fraktionen 5.2 und 5.3 konnten durch mehrfaches Rezyklieren mit LM3 in die beiden Komponenten Isopetasin (**1b**) und Neopetasin (**2b**) aufgetrennt werden ( $t_R(\mathbf{1b}) = 15,2$  min,  $t_R(\mathbf{2b}) = 16,8$  min). Eine gute Trennung der beiden Komponenten konnte auch mit LM4 erreicht werden ( $t_R(\mathbf{1b}) = 10,0$  min,  $t_R(\mathbf{2b}) = 10,6$  min). Die beiden zur Quantifizierung verwendeten Verbindungen wurden noch mit LM5 gereinigt, wobei sich die Elutionsreihenfolge änderte:  $t_R(\mathbf{1b}) = 9,3$  min,  $t_R(\mathbf{2b}) = 8,0$  min. Mengenmässig betrug der Anteil der beiden Komponenten **1b** und **2b** an der Zone 5 20%.

Die beste Trennung der komplexen Fraktion 5.4 konnte mit LM6 erreicht werden. Mindestens fünf Verbindungen wurden nachgewiesen, aber nur zwei Komponenten durch Rezyklierung rein isoliert. Die eine (**5b**) wurde zum erstenmal aus *P. hybridus* isoliert, während sich die andere als **2e** erwies. Mengenmässig betrug der Anteil der Fraktion 4 an der Zone 5 13%.

Die Fraktion 5.5 war bereits genügend rein zur Strukturklärung und wurde als Petasin (**3b**) identifiziert. Die Trennung erfolgte mit LM7 ( $t_R(\mathbf{3b}) = 16,8$  min). Eine zusätzliche Reinigung erfuhr die zur Quantifizierung verwendete Verbindung **3b** mit LM5, wobei noch eine kleine Verunreinigung abgetrennt werden konnte ( $t_R(\mathbf{3b}) = 8,8$  min). Mengenmässig betrug der Anteil der Komponente **3b** an der Zone 5 59%.

Die Fraktion 5.6 bestand aus zwei Komponenten (**3c** und **3d**), welche mit LM8 getrennt werden konnten ( $t_R(\mathbf{3c}) = 13,6$  min und  $t_R(\mathbf{3d}) = 14,6$  min). Beide Komponenten liessen sich auch mit LM5 trennen:  $t_R(\mathbf{3c}) = 9,0$  min und  $t_R(\mathbf{3d}) = 7,3$  min. Mengenmässig betrug der Anteil der Komponenten **3c** und **3d** an der Zone 5 7%.

Die Auftrennung der Zone 7 in fünf Komponenten gelang basislinientrennt mit LM9 ( $t_R(\mathbf{2g}) = 12,3$  min,  $t_R(\mathbf{3g}) = 13,4$  min,  $t_R(\mathbf{1f}) = 16,0$  min,  $t_R(\mathbf{2f}) = 17,3$  min und  $t_R(\mathbf{3f}) = 18,4$  min). Haupt-

komponenten: Neo-S-petasin (**2f**)/S-Petasin (**3f**) 2:1 (Bestimmung mittels <sup>1</sup>H-NMR).

#### 4.6. Anal. Extraktion und Probenvorbereitung

In einem 250-ml-Rundkolben wurden ca. 3 g des Pflanzenpulvers mit 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt und während 10 min in einem Ultraschallbad (Bransonic, Bender & Hobein) extrahiert. Anschliessend wurde die Suspension während 5 min mit einem Hochleistungs-Dispergiergerät (Kinematica, Polytron) homogenisiert und am Rührstab 'klebendes' Material mit wenig Extraktionsmittel abgespült. Der Extrakt wurde für weitere 5 min im Ultraschallbad belassen und über Celite (G3-Glasfilternutsche) in einen 100 ml Rundkolben filtriert. Zur Vervollständigung der Extraktion wurde der Rückstand erneut in 25 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und während 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Nach Filtration über Celite wurde das vereinigte Filtrat durch einen 0,45 µm HPLC-Nylon-Spritzenfilter filtriert, die gelbliche Lösung i. RV. einrotiert und der ölige Gesamtextrakt i. HV. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet: ca. 75 mg, Analyse mittels HPLC.

#### 4.7. Anal. HPLC

Chromatographische Bedingungen zur Trennung des Gesamtextraktes: Normalphasen-Gradienten-Trennung auf Nucleosil mit Eluent A: Hexan, Eluent B: (i-Pr)<sub>2</sub>O/MeCN (9:1, v/v), Gradientenprogramm: 0–17 min: 14,75% B in A+B (isokratisch), –28 min: –40% B in A+B (linear), –32 min: 40% B in A+B (isokratisch), –35 min: –14,75% B in A+B (linear). Fluss: 1 ml/min; Detektion: PDA (254 nm); Temp.: RT.; Totzeit: 2,8 min; Konzentration: 41,7 µg/10 µl (Injektionsvolumen).

Isokratische Trennung von Isopetasol und Petasol auf Nucleosil erfolgte mit: 10% B in A+B (A: Hexan, B: i-PrOH). Fluss: 1,5 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 254 nm, die Retentionszeiten betragen  $t_R(\text{Isopetasol}) = 10,61$  min bzw.  $t_R(\text{Petasol}) = 11,32$  min.

Eingegangen am 29. Juli 1994

- [1] 9. Mitteilung über Petasites-Inhaltstoffe. 8. Mitteilung: H. Mühle, M. Neuenschwander, *Chimia* **1983**, 37, 41.  
[2] Teil der Dissertation von B.D., Universität Bern, 1994.

- [3] K. Bucher, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **1951**, 213, 69.  
[4] H. Kaufmann, *Ciba-Geigy AG*, persönliche Mitteilung.  
[5] A. Aebi, J. Büchi, T. Waaler, E. Eichenberger, J. Schmutz, *Pharm. Acta Helv.* **1955**, 29, 277.  
[6] A. Stoll, R. Morf, A. Rheiner, J. Renz, *Experientia* **1956**, 12, 360.  
[7] A. Aebi, T. Waaler, J. Büchi, *Pharm. Weekbl.* **1958**, 93, 397.  
[8] A. Aebi, C. Djerassi, *Helv. Chim. Acta* **1959**, 42, 1785.  
[9] D. Herbst, C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4337.  
[10] M. Neuenschwander, A. Neuenschwander, E. Steinegger, P. Engel, *Helv. Chim. Acta* **1979**, 62, 609.  
[11] M. Neuenschwander, A. Neuenschwander, E. Steinegger, *Helv. Chim. Acta* **1979**, 62, 627.  
[12] Am Pharmazeutischen Institut der Universität Basel ist Prof. W. Schaffner mit der Selektion und *in-vitro*-Vermehrung von *P. hybridus* beschäftigt. Die in dieser Arbeit vorgestellte HPLC-Methode kann eine entscheidende Hilfe zur Beurteilung der Zuchtergebnisse bieten.  
[13] B. Debrunner, M. Neuenschwander, *Helv. Chim. Acta*, in Vorbereitung.  
[14] K. Christen, Dissertation, Universität Bern, 1985.  
[15] Tatsächlich tritt bei der Lagerung von Wurzelknollen im Trockenschrank bei 30° sowie bei der luftdichten Lagerung des Wurzelpulvers eine Isomerisierung von Petasin (**3b**) und Neopetasin (**2b**) zu Isopetasin (**1b**) ein [2].  
[16] Auf einer kleineren MPLC-Säule (Dimensionen 26 x 230 mm) erfolgte die Trennung von durchschnittlich 1,5 g Gesamtextrakt mit Kieselgel C 560 (15–35 µm, CFU) oder Lichroprep (15–25 µm, Merck) bei einem Fluss von 12 ml/min und einem Druck von 17 bar.  
[17] Die Zonen 1, 2, 6 und 8 wurden nicht weiter untersucht.  
[18] Die Fraktion 5.1 konnte mit LM3 in zwei Haupt- (1A und 1B;  $t_R(1A) = 6,4$  min,  $t_R(1B) = 10,3$  min) und drei Nebenkomponten aufgetrennt werden. Die Strukturklärung von 1A und 1B gelang infolge allzukleiner Probenmengen aber nicht.