

Zur Alkaloidführung von *Senecio nemorensis* L., ssp. *Fuchsii* (GMEL.) Celak und *Senecio nemorensis* L., ssp. *Nemorensis* (RCHB.) Celak

H. Wiedenfeld^{a*}, H. Hendriks^b, A. P. Bruins^b und E. Röder^a

^a Pharmazeutisches Institut der Universität, An der Immenburg 4,
D-5300 Bonn-Endenich, Bundesrepublik Deutschland

^b Rijksuniversiteit Groningen, Laboratorium voor Farmacognosie en Galenische Farmacie,
Antonius Deusinglaan 2, NL-9713 AW Groningen, Niederlande

(Eingelangt am 24. Oktober 1988, angenommen am 23. März 1989)

On the Alkaloidal Content of *Senecio nemorensis* L., ssp. *Fuchsii* (GMEL.) Celak and
Senecio nemorensis L., ssp. *Nemorensis* (RCHB.) Celak

Extracts from the two *Senecio nemorensis* subspecies, ssp. *fuchsii* and *nemorensis*, ssp. *nemorensis* were analysed on their PA-content by positive and negative ion GC-MS. By this method in ssp. *fuchsii* seven and in ssp. *nemorensis* six PAs were detected and their structures elucidated.

(Keywords: *Senecio nemorensis*, ssp. *fuchsii*; *Senecio nemorensis*, ssp. *nemorensis*; Pyrrolizidine alkaloids; Platyphylline; Sarracine; Triangularine; Senecionine; Fuchsisenecionine; 1,2-Dehydrofuchsisenecionine; Doronenine; Retroisosenine; Bulgarsenine)

Einleitung

Bedingt durch den verstärkten Einsatz von Phytopharmaka in der Humanmedizin ist der Verbrauch von Heil- und Arzneipflanzen stark angestiegen. Diese Situation trifft auch auf *Senecio nemorensis*, ssp. *fuchsii* (*S. fuchsii*) zu, dem eine gute Wirksamkeit bei funktionellen Blutungen in der Frauen- und Zahnheilkunde nachgesagt wird, wobei diesem Indikationsgebiet eher volksheilkundlicher Charakter zukommt^{1–6}.

Eine botanische Abgrenzung der *S. fuchsii* von der *Senecio nemorensis*, ssp. *nemorensis* (*S. nemorensis*) kann nur schwer vorgenommen werden, da beide Pflanzen einen gleichartigen Habitus aufweisen und außerdem noch zur Bastardisierung neigen. Aufgrund der Zugehörigkeit zur Gattung *Senecio* lag bei beiden Pflanzen bezüglich ihrer Inhaltsstoffe der Verdacht nahe, daß Pyrrolizidinalkaloide (PAs) enthalten sind, die wegen ihrer möglichen toxischen Eigenschaften von Bedeutung sind. Diese Toxizität ist abhängig von der Struktur der Alkaloide, wobei solche als toxisch anzusehen sind, die in 1,2-Position des Grundkörpers (Necin) eine Doppelbindung aufweisen und an mindestens einer alkoholischen Gruppe des Necins verestert sind^{7, 8}.

Aus Vertretern der *Senecio nemorensis*-Gruppe und botanisch verwandten Arten wurden in den letzten Jahren verschiedene PAs isoliert und in ihrer Struktur geklärt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bislang untersuchten Spezies. Hierbei wurde der PA-Gehalt in *S. fuchsii* aus der Handelsdroge ermittelt. Ein mit gleichem Pflanzenmaterial durchgeführter Langzeitverfütterungsversuch an Ratten ergab, daß Extrakte aus dieser Handelsdroge eine leberkanzerogene Wirkung aufweisen⁹. Es zeigte sich jedoch bei dünn-schichtchromatographischer Unter-

Tabelle 1: PAs in Vertretern der *S. nemorensis*-Gruppe

Senecio-Taxa	PAs	Typ	Lit.
<i>fluviatilis</i> Wallr.	Seneciphyllin	Retronecin	14
	Otosenin	Otonecin	
	Florosenin	Otonecin	
<i>nemorensis</i> L., var. <i>subdecurrens</i> Griseb.	Bulgarsenin	Platynecin	15
	Nemorensin	Platynecin	16
	Oxynemorensin	Platynecin	18
	Retroisosenin	Retronecin	
<i>nemorensis</i> L., var. <i>bulgaricus</i> (Vel.) Stoj. et Steff.	Bulgarsenin	Platynecin	17
	Retroisosenin	Retronecin	
<i>nemorensis</i> L., ssp. <i>Jaquinianus</i> (Rchb.) Durand	Nemorensin	Platynecin	18
<i>nemorensis</i> L., ssp. <i>fuchsii</i> , var. nova Zlatnik	Nemorensin	Platynecin	18
<i>nemorensis</i> L., ssp. <i>fuchsii</i> (Gmel.) Celak	Fuchsisenecionin	Platynecin	12
	Senecionin	Retronecin	13
<i>cacaliaster</i> Lam.			11
	Bulgarsenin	Platynecin	19
	Sencalenin	Retronecin	
	7-Senecioylretronecin	Retronecin	
	7-Senecioyl-9-sarracinyltretronecin	Retronecin	

suchung von verschiedenen Handelsdrogen-Chargen, daß keine einheitliche Übereinstimmung in der PA-Verteilung gefunden werden konnte, was den Schluß nahe legte, daß kein botanisch gesichertes Material vorlag.

Um die Frage nach der Alkaloidführung beider Unterarten (ssp. *fuchsii* und *nemorensis*) zu klären, wurden die Pflanzen einer erneuten phytochemischen Bearbeitung unterzogen, wobei genetisch und botanisch gesichertes Material verwendet wurde.

Ergebnisse und Diskussion

Durch Einsatz einer GC-MS-Kopplung konnten in der *S. fuchsii* acht und in der *S. nemorensis* sechs PAs nachgewiesen werden. Aufgrund der ermittelten Strukturen der Alkaloide enthält *S. fuchsii* hauptsächlich untoxische PAs mit einem Gehalt von ca. 0,01 % und die *S. nemorensis* hauptsächlich toxische PAs mit einem Gehalt von ca. 0,1 %.

Nach diesen Ergebnissen darf bei der medizinischen Verwendung von *S. fuchsii* nur von botanisch gesichertem Material ausgegangen werden, wobei besonders Verfälschungen durch *S. nemorensis* und Mischformen ausgeschlossen werden müssen.

Die beiden Senecioarten wurden einer methanolischen Soxhlet-Extraktion unterzogen und nach bereits beschriebenem Verfahren aufgearbeitet^{12,13}. Während im Falle der *S. nemorensis* ein Alkaloidgemisch erhalten wurde, das aus drei PAs bestand, wurde bei der *S. fuchsii* ein Extrakt erhalten, der zunächst einer DC- und

GC-Analyse nicht zugänglich war. Dieser Extrakt wurde in $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ einer Perforation mit Petrolether unterworfen, wodurch ein gelbes Öl erhalten wurde.

Beide Proben wurden sodann nach Syllierung durch positiv- und negativ-ionen chemische Ionisation (PCI, bzw. NICI) GC-MS untersucht. Hierbei ergibt das positiv-Ionen-MS mit NH_3 als Reaktandgas MH^+ -Ionen – also Aussagen zum Molekulargewicht – und nach Elimination der Necinsäure positive Ionen, die durch den Grundkörper charakterisiert sind. Das negativ-Ionen-MS mit OH^- als Reaktandgas liefert nach Esterspaltung Aussagen zur Struktur der Necinsäure. Die Kombination beider Methoden macht somit vollständige Strukturlösung – besonders der offenkettigen PAs – möglich¹⁰. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen die PCI-

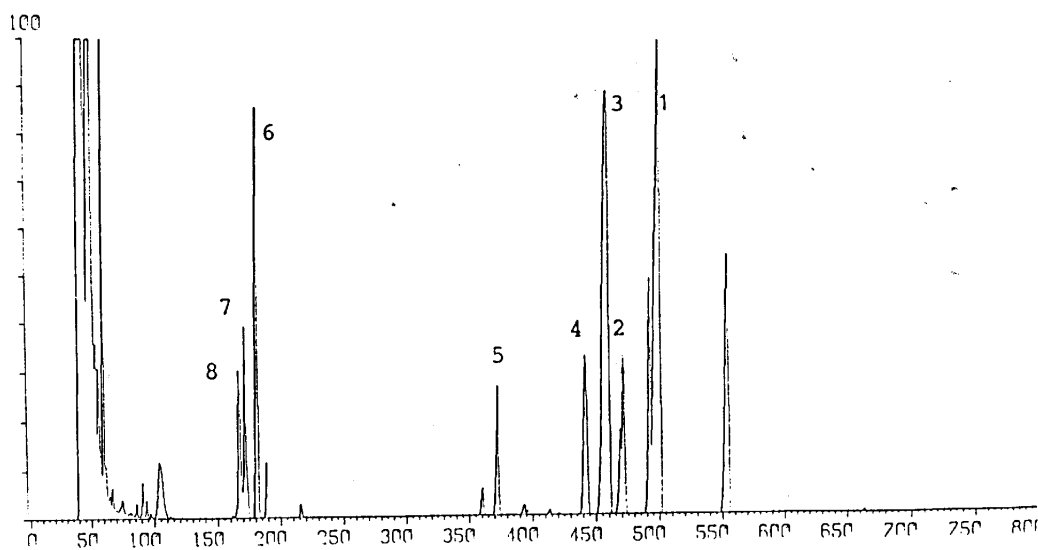


Abb. 1: GC *S. fuchsii*

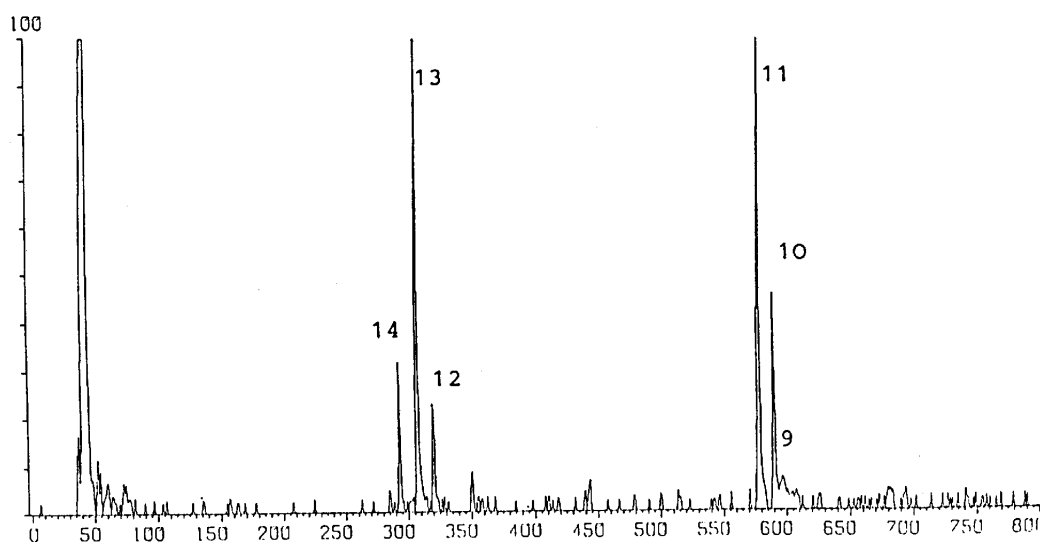


Abb. 2: GC *S. nemorensis*

Gaschromatogramme (Total Ion Current Profiles) der silylierten Extrakte von *S. fuchsii* und *S. nemorensis*.

In beiden Spezies wurden insgesamt 14 PAs identifiziert. Die aufgestellten Strukturen wurden durch Vergleich der PICI-MS- und NICI-MS-Spektren von Referenzsubstanzen bestätigt.

Wichtige Peaks der PICI-Spektren stellen neben dem $[M+1]^+$ -Ion das Ion m/e 222/220 (M-C5-Bruchstück aus der Necinsäure bei offenkettigen PAs. Dieses Fragment tritt bei makrozyklischen Verbindungen nicht auf!) und Ionen aus dem Zerfall des Necins (m/e 138 bzw. 140) dar, hier besonders m/e 120/122 (M-Necinsäure= $C_8H_{10/12}N$).

Im NICI-MS sind als markante Ionen aus dem Säurezerfall m/e 89 (Abspaltung von OTMS) und 99 zu nennen (Abspaltung eines C5-Bruchstückes der Säure, die am sekundären OH des Necins verestert ist), m/e 187 (Abspaltung von OTMS-Säureanteil am primären OH verestert) und m/e 153/154 (M-Säure-dicarbonylrest). Dieses Zerfallsschema ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

In *S. fuchsii* wurden acht PAs identifiziert, wobei drei ein Molekulargewicht von 409 aufweisen (**1–3**), wie aus dem $[M+1]^+$ -Peak von 410 im PICI-MS zu erkennen ist. Weiterhin sind die Ionen m/e 138 und 122 anwesend und, wodurch sich **1** von **2** und **3** unterscheidet, m/e 222, welches bei **1** fehlt. Weitere Strukturinformation liefern die NICI-MS, die für **2** und **3** die Fragmente 187, 135, 99 und 89, jedoch kein $[M-1]^-$ -Ion zeigen, wogegen bei **1** dieses Ion (408) und des weiteren die Ionen $426 (M+OH)^-$, 225, 153 und 89 erscheinen. Verbindung **1** wurde als Platyphyllin, **2** als Sarracin und **3** als ein Stereoisomeres von **2** erkannt.

Die Verbindung **4** wurde als Triangularin, das 1,2-Dehydroderivat des Sarracins, erkannt, wie aus den jeweils um zwei Masseneinheiten gegenüber den Zerfallsreihen von **3** geringeren Fragmenten hervorgeht, wobei im NICI-MS das $[M-1]^-$ -Anion fehlt. Produkt **5** wurde als Senecionin identifiziert, das überraschenderweise kein TMS-Derivat (M^+ : 335) bildet und ebenfalls in der NICI-Zerfallsreihe untypische Fragmente liefert.

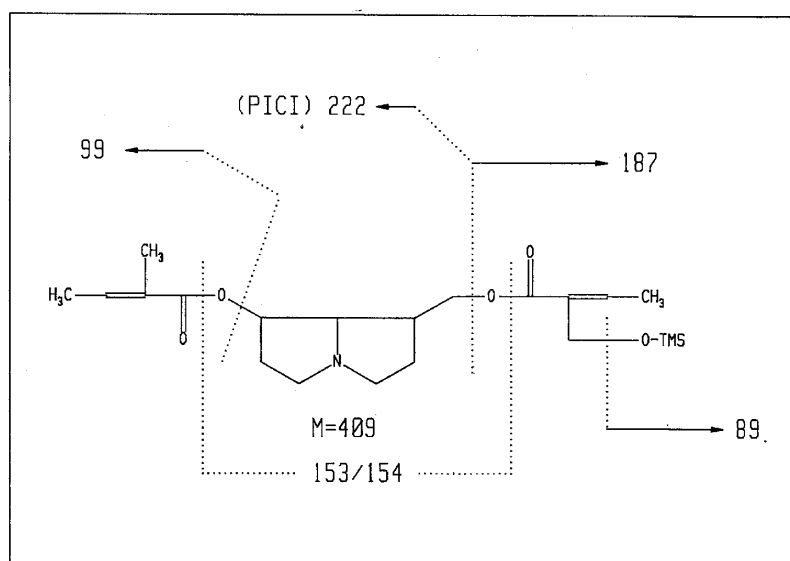


Abb. 3: Zerfallsschema des NICI-MS

Alkaloid **6** stellt Fuchsisenecionin und **7** sein 1,2-Dehydroderivat dar, wobei die Frage offen bleiben muß, ob **7** nativ vorliegt oder während der Aufarbeitung und Analyse entsteht.

8 wurde als Senecinsäure identifiziert, die als Artefakt der PAs Senecionin und Platyphyllin angesehen werden muß.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Schmid et al. wurde durch GC-MS-Analyse ebenfalls das Vorkommen von 7-Angelylretronecin, Fuchsisenecionin und Platyphyllin bestätigt¹¹. Der PA-Extrakt von *S. nemorensis* enthält hauptsächlich makrozyklische Diester, die durch PICI- und NICI-Analyse schwieriger zu bestimmen sind als die offenkettigen PAs. Deshalb wurde dieser Extrakt sowohl der PI-, bzw. NICI-GC-MS als auch einer einfachen GC-MS-Analyse ohne Silylierung unterworfen.

Dabei konnten durch letzteres Verfahren in *S. nemorensis* drei PAs (**9**=Doronenin, **10**=Retrososenin und **11**=Bulgarsenin) und durch PICI- und NICI-GC-MS drei weitere Verbindungen, die die Strukturisomere des Fuchsisenecionins, bzw. bei **13** identische MS-Fragmentierung wie Fuchsisenecionin aufweisen, identifiziert werden.

Diese drei letzten PAs liegen jedoch nicht nativ in der Pflanze vor, sondern entstehen bei der Lagerung des Extraktes und bei der GC-MS-Analyse. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft muß vermutet werden, daß es sich um Artefakte der PAs Doronenin und Bulgarsenin handelt.

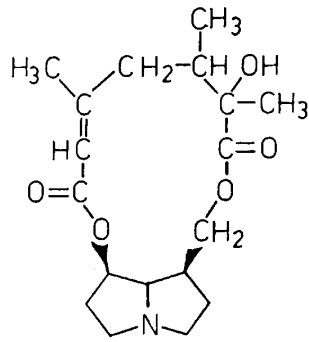
Eine Übersicht über die PA-Strukturen gibt Abbildung 4 wieder.

Experimenteller Teil

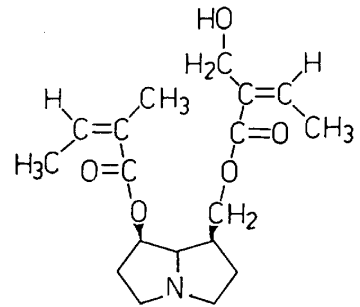
Die Pflanzenextrakte wurden nach bereits beschriebenem Verfahren hergestellt^{12,13}.

GC-MS-Analysen: Eine geeignete Probe sowohl der Pflanzenextrakte als auch der Referenzverbindungen wurde zur Entfernung von evtl. vorhandenem H₂O jeweils in 1 ml Dimethoxypropan aufgenommen, einem N₂-Strom ausgesetzt. Der Rückstand wurde 2 Std. lang bei 60° C silyliert mit Tri-Sil TBT (Pierce, Rockford, Illinois), was ein Gemisch (v/v) von TMS-Imidazol (TSIM), Bis-TMS-Acetamid (BSA) und Trimethylchlor-silan 3:3:2 darstellt. 1 µl des Reaktionsgemisches wurde analysiert auf einem modifizierten „Finnigan 3300/6110 Quadrupole GC/MS/Computer System“, das mit einer normalen chemischen Ionisationsquelle ausgestattet ist. Fused-Silica-Kapillarsäule, 25 m × 0,32 mm CP Sil 5 (Chrompack, Middelburg, Niederlande). Temperaturprogramm 150–325° C; 6°/Min. Die PICI GC-MS-Analysen wurden mit NH₃ als Reaktandgas bei einem Quellendruck von 40 Pa und einer kalibrierten Quellentemperatur von 250° C durchgeführt. Bei den NICI GC-MS-Analysen wurde zur Erzeugung von OH⁻-Ionen unter gleichen Bedingungen ein Gemisch von N₂O und CH₄ verwendet. Ein direkter Vergleich der R_f-Werte in beiden Pflanzenproben ist nicht möglich, da die beiden Extrakte unter verschiedenen GC-Bedingungen (Temperaturprogrammierung) analysiert wurden. Die Aufnahme und Speicherung der MS-Spektren erfolgte direkt nach GC-Injektion. Im Verlauf der Analyse wurden jeweils 800 Spektren mit einer Geschwindigkeit von 1,8 Sek./Spektrum ermittelt. Die übrigen apparativen Bedingungen entsprechen denen wie bereits beschrieben¹⁰.

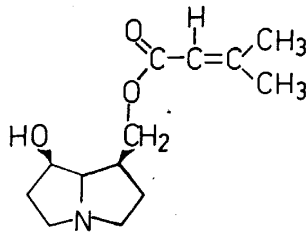
Die GC-MS-Spektren der Verbindungen **9–11** wurden auf einem Finnigan-Mat 1020 B durchgeführt. Fused-Silica-Kapillarsäule, 30 m × 0,32 mm; DB-5; Tem-



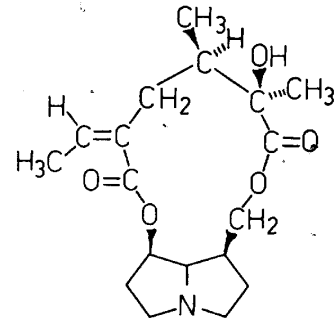
Bulgarsenin



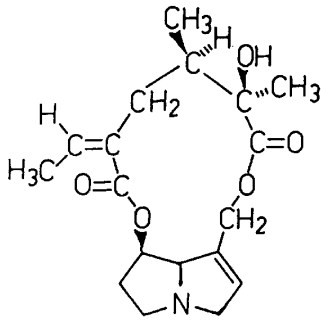
Sarracin



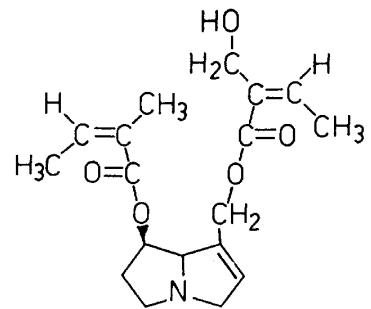
Fuchsisenecionin



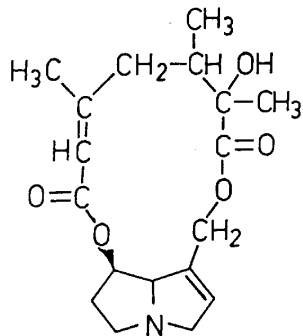
Platyphyllin



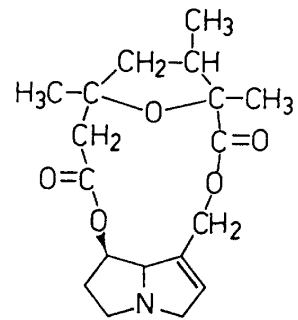
Senecionin



Triangularin



Doronenin



Retroisosenin

Abb. 4: **Strukturen der PAs**

peraturprogramm 180°–270° C; 10°/Min.; nach Direkteinlaß wurden 535 Spektren mit einer Geschwindigkeit von 1 Sek./Spektrum aufgenommen; 70 eV, 180° C.

MS: m/z (rel. Int [%]):

PICl: **1:** 412 (7,8), 411 (30,6), 410 (100), 123 (5,1), 122 (11,8). **2:** 412 (7,1), 411 (28,6), 410 (100), 222 (2,1), 138 (4,1), 122 (8,2). **3:** 412 (8,6), 411 (31,6), 410 (100), 409 (4,5), 408 (11,0), 222 (1,6), 138 (5,5), 122 (9,8). **4:** 410 (9,4), 409 (29,8), 408 (100), 220 (4,5), 136 (2,2), 120 (5,9). **5:** 338 (1,8), 337 (18,0), 336 (100), 136 (1,4), 120 (6,9). **6:** 314 (5,5), 313 (22,2), 312 (100), 195 (1,5), 96 (2,7), 95 (7,3). **7:** 312 (5,3), 311 (22,4), 310 (100), 193 (0,5), 94 (2,2), 93 (7,8). **8:** 435 (24,5), 434 (43,7), 433 (100), 334 (21,8), 333 (94,1), 315 (4,1), 90 (23,7). **12:** 312 (3,8), 311 (1,3), 310 (9,9), 309 (2,7), 308 (3,5), 218 (28,8), 208 (57,6), 138 (9,0), 135 (60,7), 120 (61,3), 118 (100). **13:** 314 (100), 313 (98,7), 312 (94,5), 294 (6,9), 230 (9,4), 222 (5,2), 220 (2,7), 140 (53,2). **14:** 314 (10,5), 313 (27,3), 312 (100), 252 (2,2), 228 (1,6), 212 (2,5), 140 (17,3), 122 (7,5).

NIcI: **1:** 427 (8,1), 426 (8,4), 409 (23,3), 408 (97,9), 336 (42,3), 287 (6,1), 269 (11,8), 225 (100), 153 (13,9), 89 (11,0). **2:** 187 (6,5), 135 (14,3), 99 (45,3), 89 (100). **3:** 310 (2,7), 187 (10,2), 135 (21,8), 99 (80,0), 89 (100). **4:** 187 (12,4), 99 (74,1), 97 (19,6), 89 (100). **5:** 335 (18,4), 334 (100), 154 (26,7). **6:** 311 (3,5), 310 (29,6), 99 (100), 97 (20,4), 89 (13,9). **7:** 309 (7,6), 308 (100), 99 (58,0), 89 (45,1). **8:** 354 (100), 336 (28,2). **12:** 306 (6,5), 234 (4,2), 116 (85,9), 99 (17,1), 97 (11,5), 89 (100). **13:** 312 (3,8), 311 (7,7), 310 (14,8), 248 (2,4), 146 (7,8), 134 (12,0), 116 (17,0), 99 (100), 97 (31,1), 89 (48,5). **14:** 310 (24,1), 249 (5,5), 238 (3,9), 172 (11,2), 146 (12,0), 134 (17,6), 116 (24,7), 99 (54,5), 97 (23,8), 89 (100).

EI: **9:** 335 (1,6), 291 (3,8), 248 (3,6), 218 (1,2), 148 (1,4), 138 (41,6), 137 (20,5), 136 (95,6), 121 (43,9), 120 (70,1), 119 (53,2), 106 (24,8), 95 (40,4), 94 (42,9), 93 (49,5), 80 (37,0). **10:** 335 (0,5), 291 (1,4), 248 (2,3), 236 (0,5), 220 (9,7), 138 (17,0), 137 (7,0), 136 (32,9), 121 (33,9), 120 (80,8), 119 (100), 106 (9,0), 95 (26,4), 94 (23,2), 93 (34,0), 80 (17,7). **11:** 337 (0,2), 310 (0,3), 276 (0,9), 250 (0,7), 222 (0,9), 211 (6,8), 180 (10,1), 168 (1,3), 156 (6,6), 140 (72,7), 139 (6,4), 138 (40,4), 123 (36,5), 122 (71,2), 121 (11,4), 108 (12,1), 97 (4,5), 96 (33,9), 95 (18,3), 82 (100).

Dank

Herrn Dr. J. H e r b o r g, Systematisch-Geobotanisches Institut der Universität Göttingen, danken wir für das genetisch einwandfreie Drogenmaterial von *S. fuchsii* und *S. nemorensis* (Herkunftsort: Harz).

Herrn Prof. Dr. W. S c h u m a c h e r, Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn, danken wir für eine Probe *S. nemorensis* (Herkunftsort: Eifel).

Literatur

- ¹ B. M a n s t e i n : Zentralbl. Gynaekol. **42**, 1672 (1953).
- ² H. J o r d a n : Therapiewoche **6**, 432 (1956).
- ³ E. S c h l ü r e n : Z. Allgemein. Med. **50**, 1572 (1974).
- ⁴ E. S c h m i d t : Zahnärztl. Praxis **15**, 5 (1953).
- ⁵ W. K l a t t : Zahnärztl. Rundschau **62**, 590 (1953).
- ⁶ F. W e i ß : Lehrbuch der Phytotherapie, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1985.
- ⁷ E. R ö d e r : Pharm. uns. Zeit **13**, 33 (1984).
- ⁸ H. W i e d e n f e l d und E. R ö d e r : Dtsch. Apoth. Ztg. **124**, 2116 (1984).
- ⁹ H. H a b s, M. H a b s, H. M a r q u a r d t, E. R ö d e r, D. S c h m ä h l und H. W i e d e n f e l d : Arzneim. Forsch., **32**, 144 (1982).
- ¹⁰ H. J. H u i z i n g, F. d e B o e r, H. H e n d i k s, W. B a l r a a d j s i n g and A. P. B r u i n s : Biomed. Environ. Mass Spectrom. **13**, 293 (1986).
- ¹¹ P. S c h m i d, J. L ü t h y, U. Z w e i f e l, A. B e t t s c h a r t and C h. S c h l a t t e r : Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **78**, 208 (1987).

- ¹² E. Röder und H. W i e d e n f e l d : *Phytochemistry* **16**, 1462 (1977).
- ¹³ H. W i e d e n f e l d und E. Röder : *Phytochemistry* **18**, 1083 (1979).
- ¹⁴ A. Klasek, B. Sula und F. Santavy : *Coll. Czech. Chem. Commun.* **38**, 2658 (1973).
- ¹⁵ A. Klasek, P. Sedmera, J. Vokoun, A. Boeva, S. Dvorackova und F. Santavy : *Coll. Czech. Chem. Commun.* **45**, 548 (1980).
- ¹⁶ E. Röder, H. W i e d e n f e l d und M. Frisse : *Phytochemistry* **19**, 1275 (1980).
- ¹⁷ T. N. Nguyen, P. Sedmera, A. Klasek, A. Boeva, L. Drjanovska, L. Dolejs und F. Santavy : *Coll. Czech. Chem. Commun.* **41**, 2952 (1976).
- ¹⁸ A. Klasek, P. Sedmera, A. Boeva und F. Santavy : *Coll. Czech. Chem. Commun.* **38**, 2504 (1973).
- ¹⁹ E. Röder, H. W i e d e n f e l d and R. Britz-Kirstgen : *Phytochemistry* **23**, 1761 (1984).