

# Projektbericht

## Isolierung und Charakterisierung von Palustrin aus Sumpfschachtelhalm (*Equisetum palustre*)

### Projektantrag:

PJ 058/07

„Sicherung Feuchtgrünland – Isolierung des Palustrins aus dem Sumpfschachtelhalm“  
bewilligt am 19.11.2007

### Projektzeitraum:

01.04.2008 bis 30.09.2008

### Projektziel:

Das Ziel des Teilprojektes ist es, Palustrin aus *Equisetum palustre* zu isolieren und chemisch/physikalisch zu charakterisieren. Die zu isolierende Menge sollte ca. 100 mg in ausreichender Reinheit betragen. Das isolierte Palustrin wird als Referenzsubstanz für die Methodenentwicklung zur Analyse von Palustrin in Futterproben an Kooperationspartner abgegeben. Dort wird eine entsprechende Analysetechnik zum sensitiven Nachweis von Palustrin aus Futterproben erarbeitet.

### Projektleiter:

Dr. Till Beuerle  
Technische Universität Braunschweig  
Institut für Pharmazeutische Biologie  
Mendelssohnstr. 1  
38106 Braunschweig  
Tel.: 0531 391 5385  
e-mail: t.beuerle@tu-bs.de

## 1. Einleitung

Palustrin ist das Hauptalkaloid des Sumpfschachtelhalmes (*Equisetum palustre*). Palustrin ist eine für Säugetiere toxische Substanz (LD<sub>50</sub> (Maus subcutan) 1 mg/kg [1]) und wurde in der Vergangenheit als Gefahr für die Weidetierhaltung betrachtet. Um das Risiko einer eventuellen Kontamination von Tierfutter mit *E. palustre* und dessen Einfluss auf die Tiergesundheit besser abschätzen zu können, sind analytische Arbeiten notwendig, die den exakten Palustrin-Gehalt in Tierfutter ermitteln können.

Das hier beschriebene Projekt stellt den ersten notwendigen Schritt für diese Untersuchungen dar. In dem Projekt wurde Palustrin als Reinsubstanz aus *E. palustre* isoliert und die chemisch/physikalische Identität überprüft und dokumentiert.

Das hierbei isolierte Palustrin (120mg) wird Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt, die mit dieser Substanz eine analytische Methode entwickeln werden, mit der eine Palustrin- bzw. *E. palustre*-Kontamination von Tierfutter exakt quantitativ bestimmt werden kann.

## 2. Experimental-Teil

### 2.1 Ernte und Vorbereitung des Rohmaterials

Grüne, oberirdische *E. palustre*-Pflanzenteile von zwei verschiedenen Standorten (Asseler Sand und Ochsenmoor) wurden von Frau Most (Nds. Landesamt f. Wasserwirtschaft, Lüneburg) und Herrn Jürgen Göttge-Krogmann (NLWKN, Hannover-Hildesheim) zur Verfügung gestellt. Das Pflanzenmaterial wurde von Herrn Hillegeist (Julius Kühn-Institut (ehemals FAL), Braunschweig) weiterverarbeitet. Das Pflanzenmaterial wurde bei Bedarf grob zerkleinert und für 48 Stunden gefriergetrocknet und anschließend mittels einer Brabender-Mühle (1mm Sieb) homogenisiert. Das erhaltene Pulver wurde in verschlossenen Dosen und Plastikbeuteln bis zur Extraktion bei Raumtemperatur und Dunkelheit gelagert.

### 2.2 Extraktion des Palustrins aus *E. palustre*-Pulver

Ein 4000-ml-Zweihalsrundkolben wurde mit Petrolether beschickt. Zur Vermeidung von Siedeverzügen wurden Siedesteinchen zugegeben. Getrockneter und pulverisierter Sumpfschachtelhalm (zwischen 172 g bis 211,2 g je Hülse) wurden in eine Extraktionshülse (insgesamt 8 Hülsen) gefüllt, mit etwas Watte abgedeckt und diese mit Murmeln zusätzlich beschwert. Die Hülse wurde in einen auf den Kolben gesetzten Heiextraktionsaufsatz gestellt. Mit 20 Extraktionsdurchläufen je Hülse unter Rückfluß wurden die unpolaren Verunreinigungen entfernt. Der Petroletherextrakt wurde verworfen (nach jeder dritten Hülse mit jeweils 20 Extraktionsdurchläufen). Der Petrolether wurde von der Extraktionshülse abgedampft. Anschließend wurde mit Methanol (HPLC grade) in einer zweiten Soxhlet-Extraktionsapparatur Palustrin aus dem Sumpfschachtelhalm heiß extrahiert (10 Extraktionsdurchläufe/Hülse, Siedesteinchen). Dieser Extrakt wurde am Rotationsverdampfer vollständig eingeeengt (zähe dunkelgrüne Masse).

### 2.3 Ausschütteln

Der Extrakt wurde in 250 ml 1M HCl (pH-Wert = 1-2) aufgenommen. Anschließend wurden unpolare Verunreinigungen durch Ausschütteln mit Dichlormethan (5 x 100 ml) entfernt. Die wässrige Phase die, das Palustrin enthielt, wurde mit NH<sub>3</sub> alkalisiert (pH-Wert = 12). Durch erneutes Ausschütteln mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 150 ml) wurde das Palustrin

in die organische Phase überführt. Polare Verunreinigungen werden mit der wässrigen  $\text{NH}_3$ -Phase entfernt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde als Rohprodukt ein zähes, dunkelgrünes Öl erhalten.

In einem kleinen Teil der aufkonzentrierten  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte wurde nach mehrtägigem Stehen bei  $4^\circ\text{C}$  die Bildung größerer Einkristalle beobachtet. Diese wurden abfiltriert, mit Aceton gespült und per Röntgenstruktur analysiert. Es wurde festgestellt, dass es sich bei den Kristallen um Palustrin-Hydrochlorid mit einem Molekül Dichlormethan handelt. Die Untersuchung der Kristalle konnte zur eindeutigen Bestimmung der Stereochemie des Zielmoleküls herangezogen werden.

## **2.4 Flash-Chromatographie**

Die Flash-Chromatographie erfolgte mit einem VersaFlash Purification System® mit zugehöriger Lösungsmittelpumpe (Supelco, München, Deutschland) an einer  $40 \times 75 \text{ mm}$  Kieselgel-Kartusche mit dem Laufmittelgemisch  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_{3\text{conc.}}$ , 85:15:1. Die Flußrate wurde zwischen 5-10 ml/min (15-30% Setting an der Pumpe) gewählt. Fraktionen zu 10 ml wurden gesammelt (insgesamt 120 Stück). Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (Merck, Kieselgel 60, Darmstadt, Deutschland) analysiert (Fließmittel wie Flash-Chromatographie). Die Detektion des Palustrins erfolgte durch das Besprühen mit Dragendorff-Reagenz [2]. Fraktionen, die Palustrin enthielten, wurden vereinigt und erneut eingengt. Als Produkt wurde ein grünes, zähes Öl erhalten.

## **2.5 Darstellung von Palustrin-Hydrochlorid [5]**

Das ölige Produkt wird anschließend in 2N HCl gelöst und mit  $\text{CHCl}_3$  extrahiert. Die wässrige Phase wird im Vakuum zur Trockene einrotiert und Palustrin-Hydrochlorid und Dihydrochlorid nach Umkristallisation aus Ethanol/Isopropanol (1:1) als Feststoff erhalten (z.T. leicht grünlich gefärbt). Die farblichen Verunreinigungen wurden durch mehrmaliges Waschen mit kleinen Mengen Aceton soweit wie möglich entfernt und nach Trocknung ein nahezu farbloses Pulver erhalten.

## 2.6 Darstellung von Palustrin

Das Palustrin-Hydrochlorid/Dihydrochlorid-Gemisch wurde in 1N NaOH gelöst und fünfmal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden ca. 180 mg Palustrin in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

## 3. Identifizierung des Palustrins

(Original-Daten: siehe Anhang A und B (NMR))

**IR** (Diamond-ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3348 cm<sup>-1</sup> (m), 3279 (m), 3102 (w), 3025 (m), 2963 (m), 2940 (m), 2918 (m), 2879 (m), 2844 (m), 2815 (m), 1635 (s), 1564 (s), 1441 (m), 1370 (m), 1347 (m), 1327 (m), 1312 (m), 1263 (m), 1243 (m), 1215 (m), 1195 (m), 1171 (m), 1156 (m), 1128 (m), 1087 (m), 1051 (m), 1035 (m), 976 (s), 928 (w), 887 (w), 826 (m), 806 (m), 732 (m), 704 (s), 637 (s), 589 (m), 553 (m).

**UV (MeOH):**  $\lambda_{\max}$  = 202 nm

### Spezifischer Drehwinkel:

$[\alpha]_D^{589} = 11.3$  (Methanol; 23°C)

### Elementaranalyse:

C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (309.4469): ber. C 65.98, H 10.10, N 13.58; gef. C 65.82, H 9.89, N 13.30.

**EI-MS** (70eV):  $m/z$  (%): 309 (M<sup>+</sup>, 2), 280 (3), 252 (6), 251 (24), 250 (41), 209 (17), 208 (100), 191 (9), 180 (8), 172 (6), 171 (33), 129 (20), 122 (13), 114 (16), 112 (28), 94 (21), 84 (21), 80 (18), 72 (19), 70 (22), 67 (7), 55 (6), 41 (8).

In guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten [3].

### EI-MS (70 eV; Hochemlöfung und Akkurate-Masse):

C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (theoretisch:309.2416); gemessen: 309.2410

### ESI-MS: (Wasser:Acetonitril:Ameisensäure 50:50:0.1)

$m/z$  310 (M+H)<sup>+</sup>

**ESI-MS-MS:** (Wasser:Acetonitril:Ameisensäure 50:50:0.1)

Enhanced Product Ion nach Q2 Stoßaktivierung

m/z: 292, 263, 223, 209, 172, 166, 154 (base peak), 136, 128, 124, 114

**Röntgenstrukturanalyse:**

Prof. P. Jones (Technische Universität Braunschweig, Inst. f. Anorg. u. Analyt. Chemie): Struktur: siehe Anhang

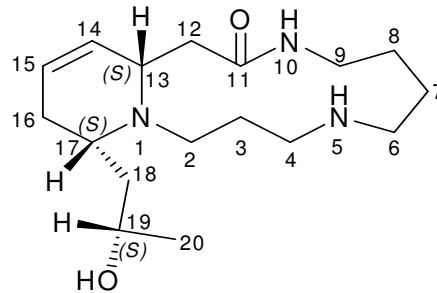
**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) und  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz) in  $\text{C}_6\text{D}_6$**

Spektren und Auswertung von Prof. L. Ernst (Technische Universität Braunschweig, Inst. f. Org. Chemie): siehe Anhang und im Vergleich zu [4].

Bei einer publizistischen Verwertung der Daten oder Teilen daraus, bitten wir um die Namensnennung der beteiligten Wissenschaftler der TU-Braunschweig.

## 4. Zusammenfassung und Bewertung

Die Abbildung 1 zeigt die von uns ermittelten Struktur- und Moleküldaten zusammengefasst aus NMR, Röntgenstrukturanalyse, massenspektrometrischen Daten und der Elementaranalyse.



Summenformel:  $C_{17}H_{31}N_3O_2$   
Exakte Masse: 309.24163  
Mw.: 309.45  
Elementzusammensetzung:  
C, 65.98; H, 10.10; N, 13.58; O, 10.34  
CAS: 22324-44-3

**Abb.1:** Struktur von Palustrin (die Nummerierung erfolgte in Anlehnung an die Röntgenstruktur (siehe Anhang)).

Nach sorgfältiger Auswertung der NMR-Daten ergibt sich eine Reinheit von größer 85%, wobei es sich bei der „Verunreinigung“ mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Konformer bzw. Isomer (z.B. ein Diastereomer) handelt, d.h. entweder treten bei den Messbedingungen unterscheidbare Konformere auf oder Palustrin ist in der Natur nicht 100% enantiomerenrein, was dann ein Diastereomerenpaar bedeuten würde. Anhand der wiederholt durchgeführten Elementaranalyse und der anderen analytischen Parameter (Dünnschicht, spezifischer Drehwert etc.), kann von einer Reinheit von > 95% ausgegangen werden (bezogen auf z.B. ein Diastereomerenpaar).

Das Ziel einer Isolierung von (100mg) Palustrin mit großer Reinheit wurde demnach innerhalb des Antragszeitraumes erreicht.

Es wird die Menge von 120mg Palustrin an die Kooperationspartner des Julius-Kühn-Instituts weitergegeben (Professor Dr. Hartwig Schulz, Quedlinburg und/oder Herr Hillegeist, Braunschweig).

## 5. Literaturverzeichnis

1. Römpp, Lexikon der Chemie, Onlineausgabe 2008.  
<http://www.roempp.com/>
2. Ehlers, E.: Analytik 1, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 2001, S. 280-1.
3. Green, C.L., Mayer, C. and Eugster, C.H., (1969); 75. Konstitution von Palustridin, *Helv. Chim. Acta*, 52(3), 673-8.
4. Ruedi, P and Eugster, C. H. (1978); Horsetail alkaloids. Part 14. Proton and carbon-13 NMR spectroscopic studies of the methyl esters of four diastereomeric ( $\pm$ )-dihydropalustramic acids; structural correlation of the methyl ester of (-)-dihydropalustramic acid with the alkaloid palustrine., *Helv. Chim. Acta*, 61(2), 899-904.
5. Wöhlbier, W. und Beckmann, S. (1950); Über die Inhaltstoffe des Sumpfschachtelhalms (*Equisetum palustre*), *Chem. Berichte*, 83 (3), 310-314.



ANHANG A: Dragendorff-Sprühreagenz nach Munier und Macheboeuf [2]

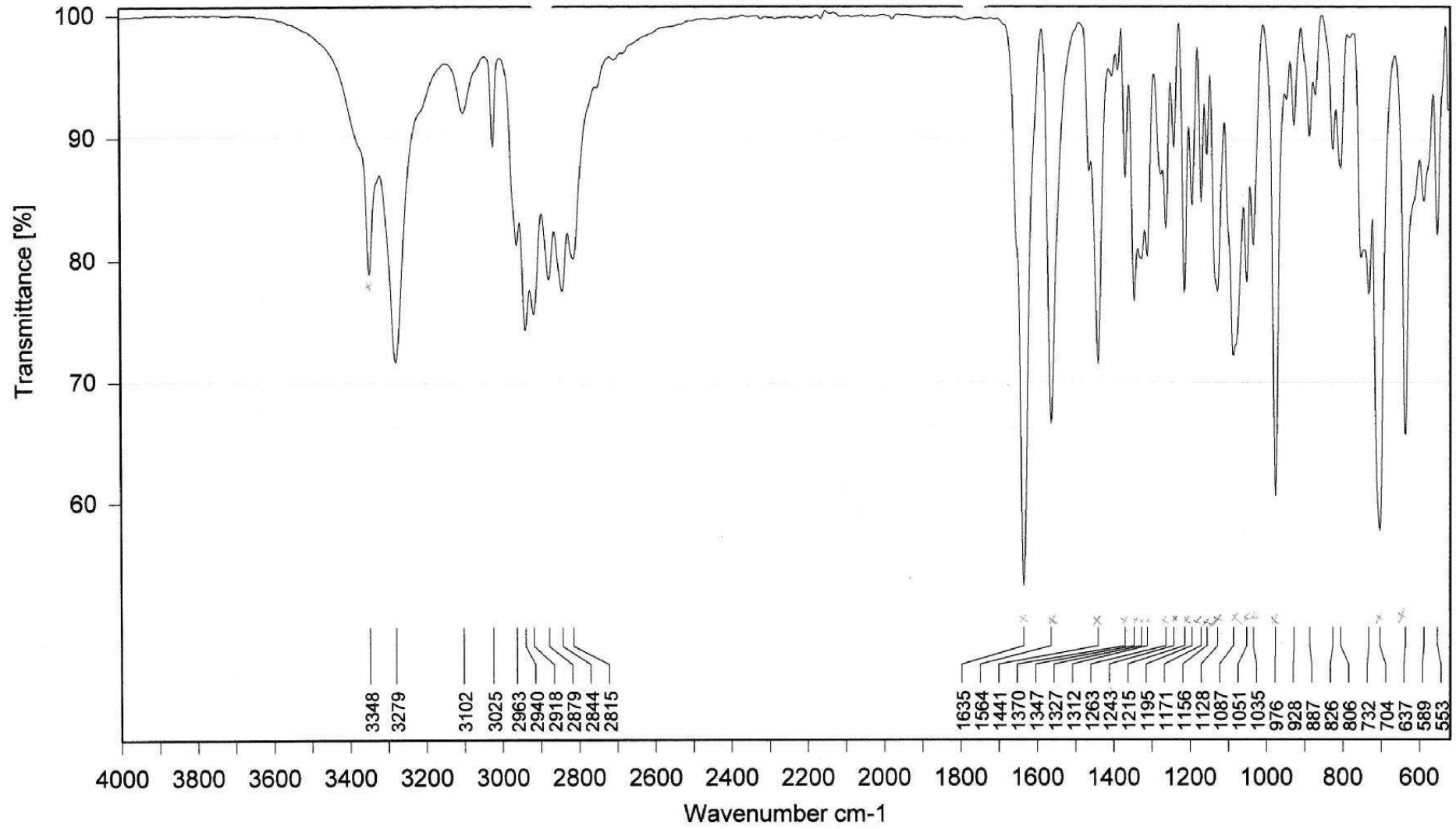
Lösung A: 0,85 g Wismut(III)nitrat, 10 ml Eisessig, 40 ml Wasser

Lösung B: 8 g Kaliumiodid in 20 ml Wasser

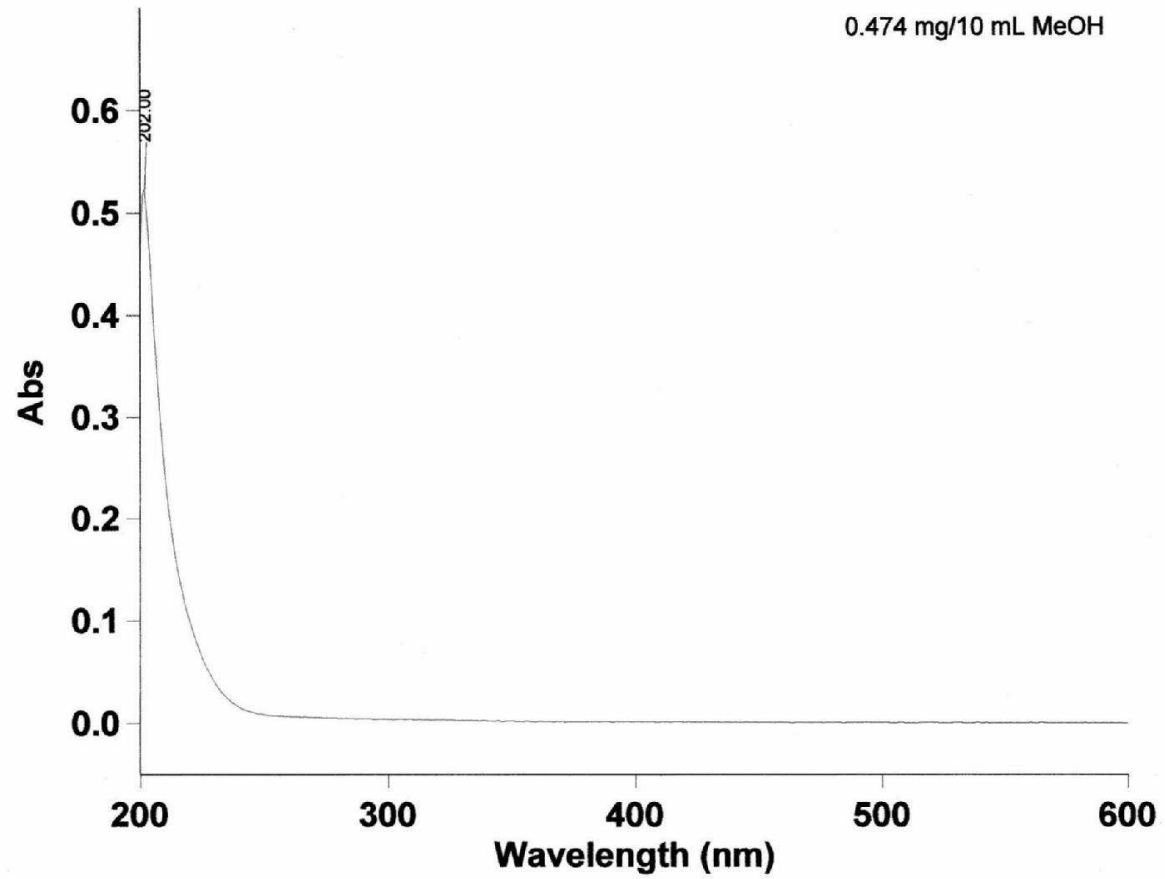
Stammlösung: Lösung A und Lösung B werden 1:1 gemischt

Sprühreagenz: 3 ml Stammlösung, 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser frisch ansetzen.

ANHANG A: IR-Spektrum



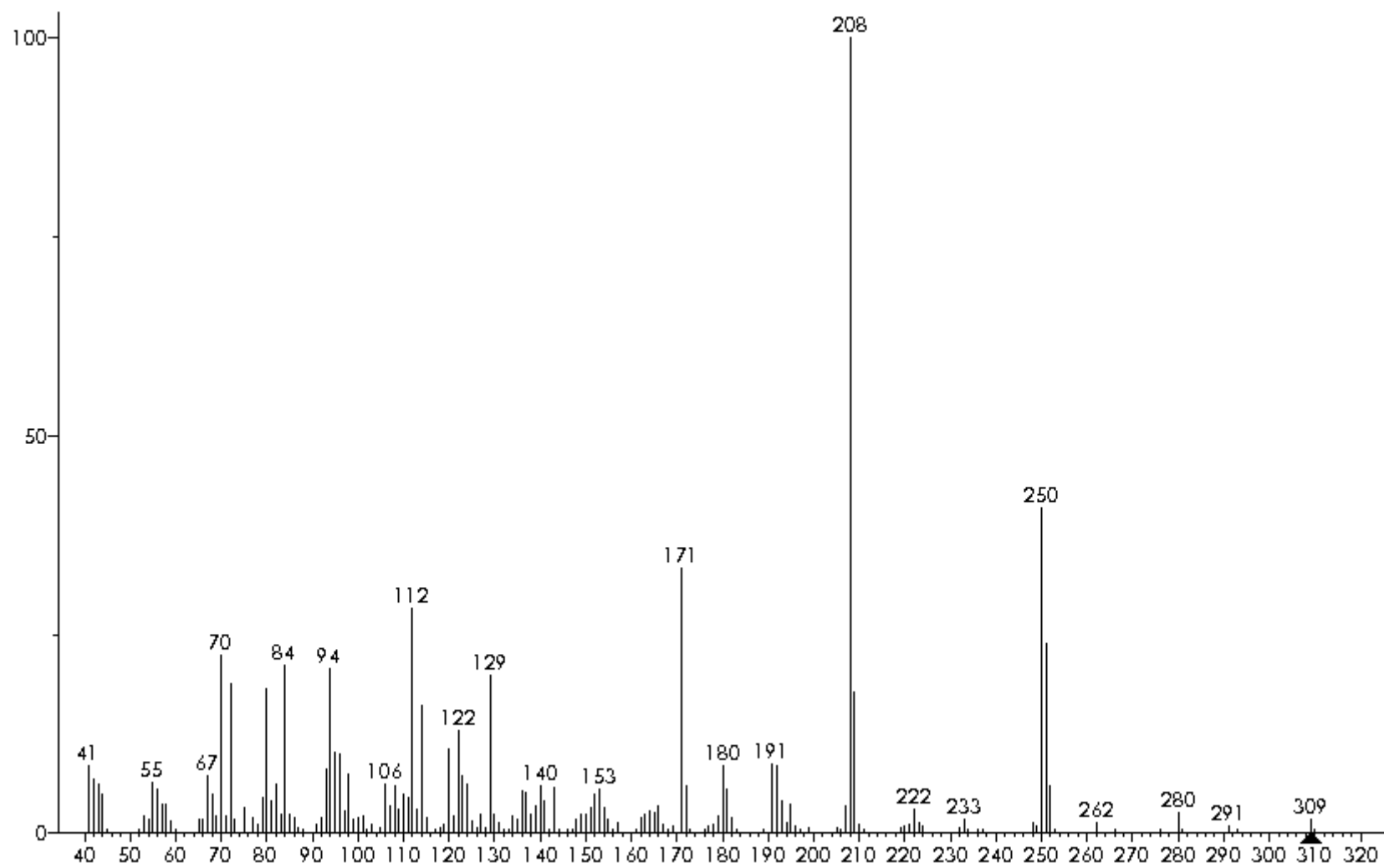
ANHANG A: UV-Spektrum in Methanol



## ANHANG A: Elementaranalyse

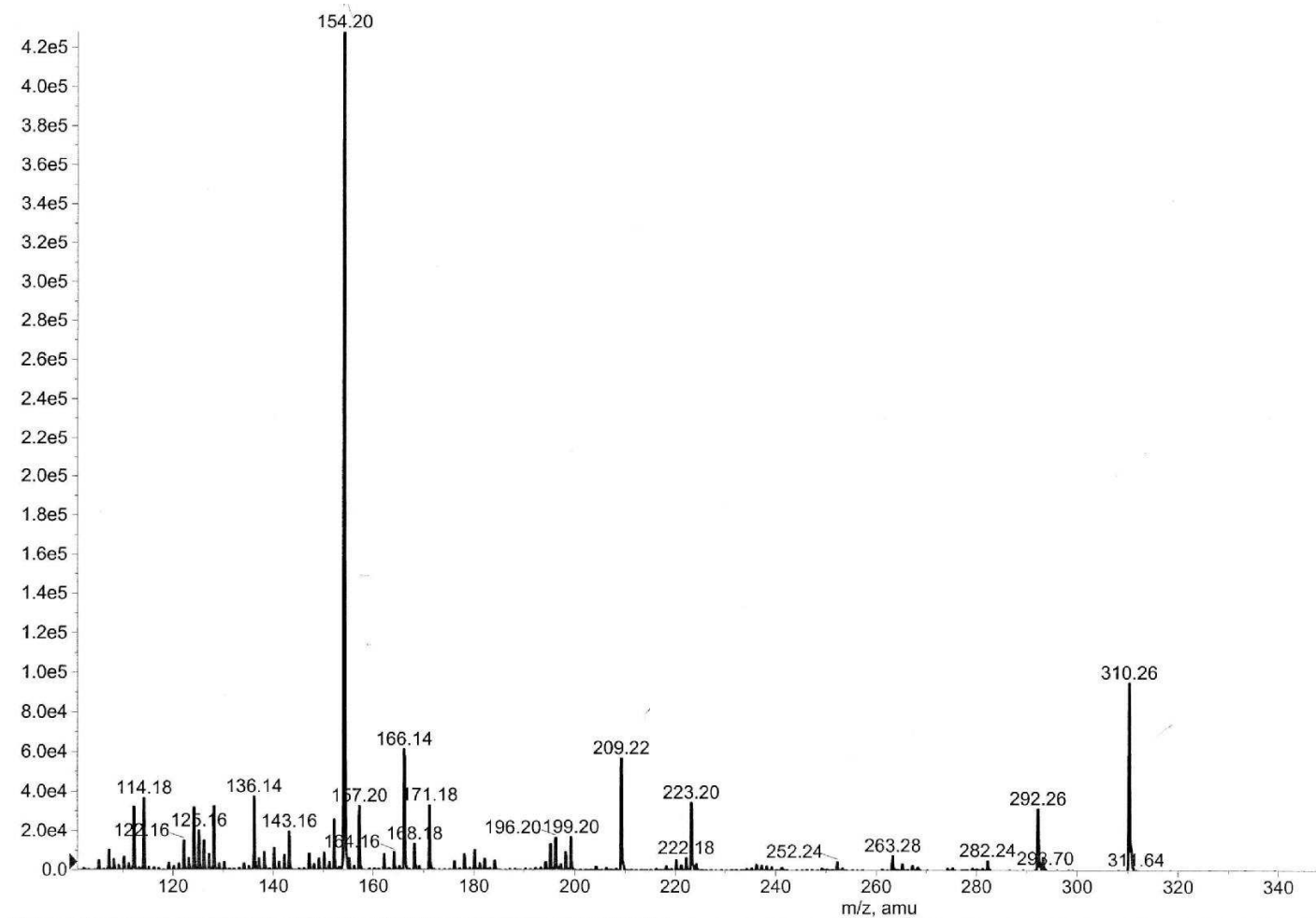
Nr. Name	C [%]	H [%]	N [%]	S [%]
16 TBeu Pal	65.862	9.962	13.308	0.000
17 TBeu Pal	65.733	9.854	13.299	0.001
18 TBeu Pal	65.866	9.864	13.296	0.003
Mittelwert [%]	65.820	9.893	13.301	0.001

# ANHANG A: EI-MS

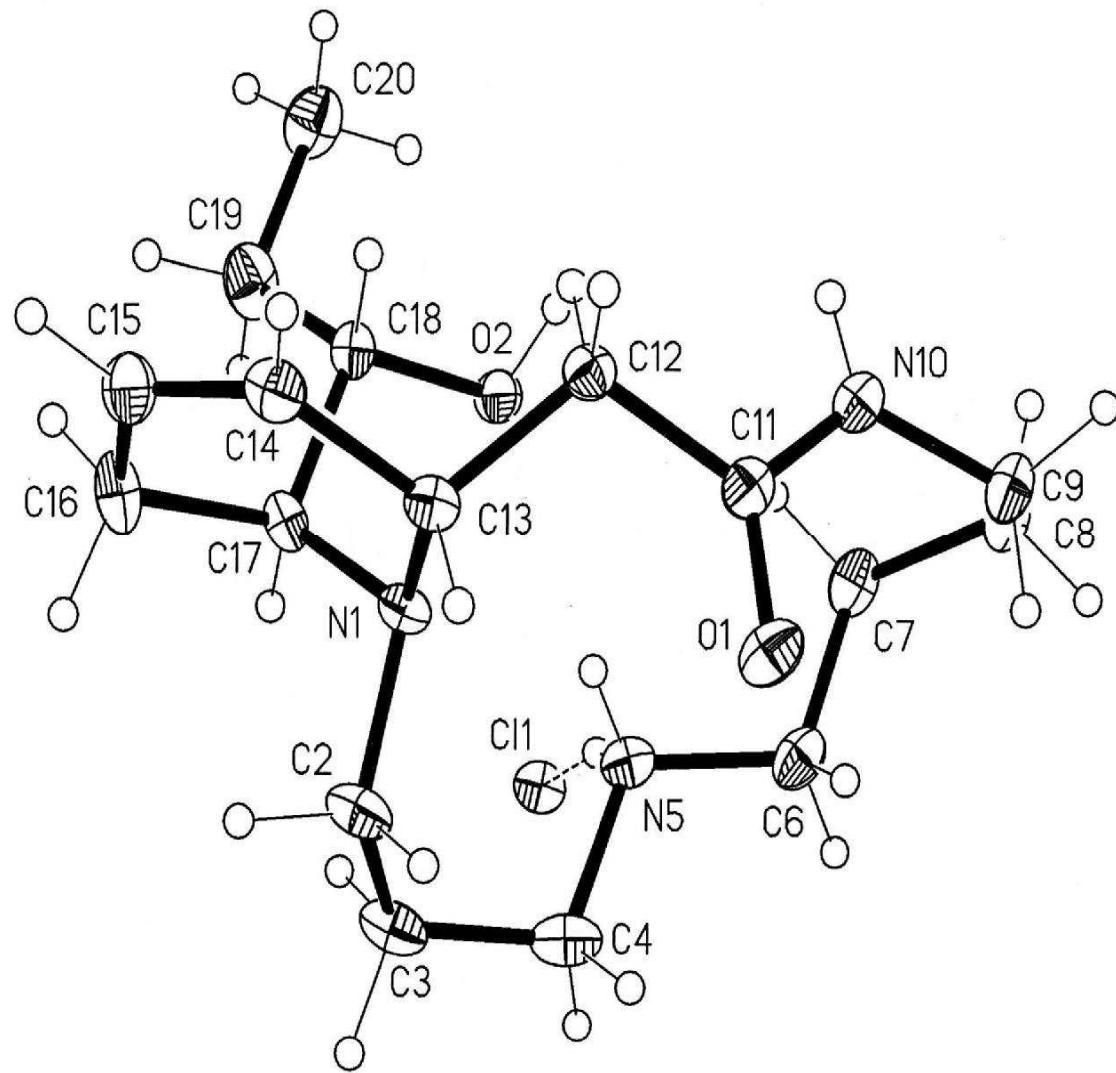




# ANHANG A: ESI-MS-MS



ANHANG A: Röntgenstruktur







## Technische Universität Braunschweig

Gemeinsame Einrichtungen des Instituts für Anorganische u.  
Analytische Chemie und des Instituts für Organische Chemie

- NMR-Laboratorium -

Hagenring 30

D-38106 Braunschweig

Prof. Dr. L. Ernst

Tel. (0531) 391-5379

Fax (0531) 391-8192

e-mail: L.Ernst@tu-bs.de

### Probe „Palustrin-AC“ von Dr. T. Beuerle

Von o. g. Probe wurden Lösungen in  $C_6D_6$  und in  $CD_3OD$  NMR-spektroskopisch untersucht, und zwar bei 600 MHz ( $^1H$ -NMR) und 151 MHz ( $^{13}C$ -NMR). Durch Einsatz zweidimensionaler Techniken (H,C-HSQC, H,C-HMBC, H,H-COSY und H,H-NOESY) wurden die chemischen Verschiebungen so weit wie möglich den zugehörigen Kernen zugeordnet. Die Ergebnisse der Messungen und die Interpretation sind den beiliegenden Tabellen zu entnehmen.

Aus den Messungen folgt, dass es sich bei der Probe eindeutig um Palustrin handelt, das zuvor u. a. von Eugster beschrieben wurde (P. Rüedi, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1978**, *61*, 899-904), dort allerdings mit der falschen Position der CC-Doppelbindung. Ein Vergleich der jetzigen  $^{13}C$ -NMR-Daten ( $C_6D_6$ , Raumtemp.) mit denen von Eugster ( $C_6D_6$ , 60 °C) weist einen Mittelwert der Verschiebungsabweichungen von 0.3 ppm auf, was in Anbetracht der unterschiedlichen Messtemperatur und der leichten Protonierungstendenz der Stickstoffatome nicht als signifikante Differenz gelten kann.

In den Spektren sind starke Signalverbreiterungen zu beobachten, die auf bei Raumtemperatur mittelschnell ablaufende konformative Prozesse zurückzuführen sind. Aus diesem Grund kann keine sehr genaue Aussage über die Probenreinheit gemacht werden. Eine Inspektion des  $^{13}C$ -NMR-Spektrums (mit starker exponentieller Multiplikation, LB = 5.0 Hz) der  $C_6D_6$ -Lösung legt aber nahe, dass die Reinheit besser als 85% ist. Ein zweiter Signalsatz der Intensität <15 % könnte einem Konformeren (kein Isomer) oder einem Isomer zukommen.

Braunschweig, 24. September 2008

L. Ernst

# ANHANG B: NMR-Auswertung von Palustrin

<b>Palustrin-AC (T. Beuerle), NMR-Untersuchungen</b>					
but93144_bb	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	309	src=-50.63, srh=-8.83	
<b>Peaks:</b> Großbuchstaben = <sup>13</sup> C-Verschiebungen sortiert nach abnehmender Größe; <b>hsqc</b> , <b>hmbc</b> : Korrelation mit den entsprechenden <sup>1</sup> H-Verschiebungen (Kleinbuchstaben); Buchstaben in Klammern: schwache Korrelationen; "a/b" oder "a-c" etc. bedeutet: keine sichere Entscheidung möglich bei ähnlichen oder identischen Verschiebungen.					
<sup>13</sup> C-NMR	151 MHz				
Peak	δ [ppm]	Intensity [rel]	dept-135	hsqc ( <sup>1</sup> J <sub>CH</sub> -Korrel.)	hmbc ( <sup>2,3</sup> J <sub>CH</sub> -Korrel.)
A	171.17	0.03	C <sub>q</sub>	-	j o
B	129.63	0.06	CH	c	(o) s/t
C	122.58	0.04	CH	b	(k) (s/t)
D	70.53	0.05	CH	e	(k) (s/t) x/y z
E	57.49	0.05	CH	f	b (c) j/k l
F	56.91	0.04	CH	k	(b) l
G	53.77	0.04	CH <sub>2</sub>	i l	n u 1.15
H	48.42	0.04	CH <sub>2</sub>	m (2 H)	(n) v
I	45.78	0.04	CH <sub>2</sub>	h n	l/m u
J	43.10	0.05	CH <sub>2</sub>	j o	-
K	38.82	0.04	CH <sub>2</sub>	d g	(v x/y)
L	28.43	0.05	CH <sub>2</sub>	s x	z
M	27.01	0.18	CH <sub>2</sub>	u w	l
N	26.78	0.05	CH <sub>2</sub>	q v	m
O	25.63	0.04	CH <sub>2</sub>	r y	m v
P	18.47	0.04	CH <sub>2</sub>	p t	b (c)
Q	10.44	0.16	CH <sub>3</sub>	z	x/y
<sup>1</sup> H-NMR	600 MHz				
Peak	ν(F1) [ppm]	Mult., J [Hz]	cosy	noesy	
a	6.82		a - d g	a - e/f j	
b	5.46		b - e f s/t (p)	b/c - e/f o p s/t	
c	5.40		c - e f (p)	d - q v	
d	3.57		d - g v	e - k s x/y z	
e	3.46		ef - j x/y [o? p?, beide zu f?]	f - h/i o	
f	3.44		g - q	g - v	
g	2.89		h - n		
h	2.69		i - l u	i - u w	
i	2.67		j - o		
j	2.50		(m - r x/y)		
k	2.47		k - i u		
l	2.44		n - h u		
m	2.41		p - s/t		
n	2.29		q - v		
o	2.15		z - r/s/t w		
p	1.91				
q	1.67				
r	1.49				
s	1.47				
t	1.46				
u	1.41				
v	1.35				
w	1.24				
x	1.20				
y	1.20				
z	1.13				

in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>/TMS

L. Ernst, 18.9.2008

*L. Ernst*

ANHANG B: 13C-NMR-Datenvergleich mit der Literatur [4].

Vergleich mit Literaturdaten:			
P. Rüedi, C. H. Eugster, <i>Helv. Chim. Acta</i> 1978, 61, 899-904 (Messung bei +60 °C)			
Peak	L.E.	Eugster	Diff
A	171.2	171.1	0.1
B	129.6	129.8	-0.2
C	122.6	123.3	-0.7
D	70.5	70.8	-0.3
E	57.5	58.4	-0.9
F	56.9	58.1	-1.2
G	53.8	53.0	0.8
H	48.4	48.4	0.0
I	45.8	46.8	-1.0
J	43.1	43.0	0.1
K	38.8	39.1	-0.3
L	28.4	28.0	0.4
M	27.0	27.7	-0.7
N	26.8	26.7	0.1
O	25.6	26.7	-1.1
P	18.5	19.4	-0.9
Q	10.4	10.1	0.3
		Mittelwert:	-0.3

L. Ernst