

# Kapitel 2

## Hauptteil

Die Auswahl der zu untersuchenden Pflanzenarten erfolgte über ein *in-vitro*-Screeningprogramm gegenüber *Plasmodium falciparum*. Dazu wurde von den zur Verfügung stehenden getrockneten und gemahlten Pflanzenteilen jeder Spezies zuerst ein lipophiler Extrakt (PE/EtOAc 1:1 [V/V]) angefertigt. Das so vorextrahierte Material wurde erneut mit einem Gemisch aus MeOH/Wasser 8:2 (V/V) behandelt, um einen hydrophilen Auszug zu gewinnen. Beide Rohextrakte wurden im semiautomatischen *in-vitro*-Test nach Desjardins et al. (1979) bei einer Fixkonzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  getestet. In Anlehnung an eine Arbeit von O'Neill et al. (1987) wurde somit ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  als Grenze zur Beurteilung der antiplasmodialen Aktivität von Pflanzenextrakten gewählt. Konnte im Inkorporationstest mittels Tritium-markiertem Hypoxanthin eine Hemmung nachgewiesen werden, so erfolgte nachträglich die Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes.

Die weiterführende Untersuchung erfolgte nach dem Prinzip der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung. Die jeweiligen Wilddrogen wurden mit geeigneten Lösemitteln möglichst vollständig extrahiert und in der Regel auf Kieselgelsäulen vorfraktioniert. Alle erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf ihre Wirkung gegen *P. falciparum* getestet. Ließ sich die Aktivität in einzelnen Fraktionen anreichern, so wurden diese je nach Substanzmenge mittels Säulenchromatographie (z. B. Kieselgel, Sephadex<sup>®</sup>), Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Dünnschichtchromatographie (DC) weiter aufgetrennt. Erhielt man schließlich Reinstoffe, so wurden diese mit Hilfe spektroskopischer Methoden (z. B. EI-MS, HR-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR) aufgeklärt und ihre antiplasmodiale Aktivität gegen den chloroquinsensitiven Stamm PoW ( $\text{IC}_{50}$ -Wert 0.011  $\mu\text{M}$  [Chloroquin]) und den chloroquinresistenten Klon Dd2 ( $\text{IC}_{50}$ -Wert 0.12  $\mu\text{M}$  [Chloroquin]) bestimmt. Als aktiv wurden solche Naturstoffe angesehen, die eine halbmaximale Hemmwirkung bis 20  $\mu\text{M}$  zeigten (Liu et al., 2001). Substanzen mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert  $> 50 \mu\text{M}$  wurden als inaktiv bewertet. In einigen Fällen wurde zusätzlich die Zytotoxizität der isolierten Verbindungen an der humanen Zelllinie EVC-304 (Tumorzellen mit endothelialen Eigenschaften) untersucht, um allgemeine zelltoxische Eigenschaften auszuschließen bzw. zu bestätigen. Setzt man die zytotoxische mit der antiplasmodialen Aktivität ins Verhältnis, so erhält man den Selektivitätsindex (SI, Kap. 5.4.5). Anhand dieses Indexes kann beurteilt werden, inwieweit die antiplasmodiale Aktivität auf eine spezifische Hemmung des Malariaerregers zurückzuführen ist.

## 2.1 *In-vitro*-Screening von Pflanzenextrakten auf Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*

### 2.1.1 Untersuchte Heilpflanzen aus Panama

Aus Panama stammten insgesamt 14 Pflanzenarten, die aufgrund von Literaturangaben (Duke, 1975; Hirschhorn, 1981; Joli et al., 1987; Gupta et al., 1993) oder aufgrund der Aussagen von Informanten vor Ort gesammelt wurden. Von diesen zeigten die lipophilen Rohextrakte von *Piper hispidum* SW., Piperaceae, *Siparuna andina* (TUL.) A.DC., *S. pauciflora* (BEURL.) A.DC., *S. tonduziana* PERK., Monimiaceae, und *Xylopia cf. frutescens* AUBL., Annonaceae, bei einer Fixkonzentration von 50 µg/ml eine *in-vitro*-Aktivität gegen *P. falciparum*. Die näheren phytochemischen Untersuchungen sind nachzulesen bei Jenett-Siems (2002) sowie Jenett-Siems et al. (1999, 2000).

Obgleich die lipophilen Rohextrakte aus der Zweigrinde und den Blättern von *Andira inermis* (W. WRIGHT) H.B.K. (Fabaceae) keine nennenswerte Aktivität im *in-vitro*-Test zeigten (IC<sub>50</sub>-Werte: 82.0 µg/ml bzw. 56.0 µg/ml, beide PoW), erschienen weiterführende Untersuchungen trotzdem lohnenswert, da diese Spezies bisher nur unzureichend phytochemisch analysiert wurde.

### 2.1.2 Untersuchte Heilpflanzen aus Zimbabwe

Aufgrund von Literaturangaben (Watt und Breyer-Brandwijk, 1962) wurden 1997 in Zimbabwe neun in der traditionellen Medizin Südafrikas genutzte Heilpflanzen gesammelt und im Screeningprogramm gegen *P. falciparum* getestet. Aufgrund der klimatischen Verhältnisse (Trockenzeit im September/Oktober) konnten nicht in allen Fällen die ethnobotanisch genutzten Pflanzenteile mitgebracht werden. In der folgenden Tabelle 2.1 sind zum einen die traditionell genutzten Drogen den tatsächlich untersuchten Pflanzenteilen gegenübergestellt, sowie die antiplasmodialen Aktivitäten der lipophilen Extrakte *in vitro* dargestellt. Die hydrophilen Extrakte zeigten alle IC<sub>50</sub>-Werte > 50 µg/ml und wurden in der Tabelle nicht berücksichtigt.

Die lipophilen Extrakte von *Artemisia afra* und *Vernonia colorata* zeigten die stärkste antiplasmodiale *in-vitro*-Aktivität mit IC<sub>50</sub>-Werten von 8.9 und 12.1 µg/ml (PoW) sowie 15.3 und 17.8 µg/ml (Dd2). Während die lipophilen Extrakte von *Cussonia spicata* (Blattdroge), *Clusia hirsuta* (Wurzeldroge) und *Vernonia natalensis* (Blattdroge) noch schwach aktiv waren (IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 30 und 50 µg/ml), erwiesen sich alle anderen lipophilen Extrakte als inaktiv. Zur weiteren Untersuchung wurden daher die beiden Asteraceen *A. afra* und *V. colorata* herangezogen.

### 2.1.3 Untersuchte Heilpflanzen aus Uganda

Die acht Pflanzenspezies aus Uganda wurden aufgrund persönlicher Informationen von Frau Dr. Bernardina Onegi (Department of Pharmacy, Makerere University, Kampala) hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität untersucht (Tab. 2.2). Eine hohe Aktivität wiesen vor allem die lipophilen Extrakte von *Momordica foetida* (Blätter) und *Stereospermum kunthianum* (Wurzelrinde) auf (IC<sub>50</sub>-Werte: 7.3 und 7.0 µg/ml [PoW];

**Tabelle 2.1:** *In-vitro*-Aktivität der lipophilen Extrakte (PE/EtOAc 1:1 [V/V]) von Heilpflanzen aus Zimbabwe gegen *Plasmodium falciparum in vitro*.

Pflanzenfamilie/Art	traditionell genutzte Pflanzenteile <sup>b</sup>	untersuchte Pflanzenteile	IC <sub>50</sub> -Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	
			PoW	Dd2
Araliaceae				
<i>Cussonia spicata</i> THUNB.	Wurzeln	Blätter	45.1	47.5
		Rinde	$\gg 50$	67.9
Asteraceae				
<i>Artemisia afra</i> JACQ.	Blätter	Kraut	8.9	15.3
<i>Vernonia colorata</i> (WILLD.) DRAKE	Blätter, Wurzeln	Blätter	12.1	17.8
<i>Vernonia natalensis</i> SCH. BIP.	Blätter, Wurzeln	Blätter	43.9	n.b.
		Wurzeln	$\sim 50$	n.b.
Chrysobalanaceae				
<i>Parinari curatellifolia</i> PLANCH. EX BENTH	Rinde	Kraut	$\gg 50$	n.b.
Euphorbiaceae				
<i>Clutia hirsuta</i> MÜLL. ARG.	Blätter	Blätter	$\sim 50$	n.b.
		Wurzeln	40.6	29.4
<i>Flueggea virosa</i> BAILL.	Blätter, Wurzeln, Zweigrinde	Kraut	$\gg 50$	n.b.
Passifloraceae				
<i>Adenia gummifera</i> (HARV.) HARMS	Blätter, Wurzeln	Zweige	$\sim 50$	n.b.
Rubiaceae				
<i>Hymenodictyon floribundum</i> B.L. ROBINSON	Wurzeln	Wurzeln	$\gg 50$	n.b.

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten<sup>b</sup> Neuwinger (2000); Watt und Breyer-Brandwijk (1962)

n.b.: nicht bestimmt

13.0 und 16.8  $\mu\text{g/ml}$  [Dd2]). Außer dem Stammrindenextrakt von *Albizia coriaria* waren die restlichen sechs Pflanzenextrakte moderat aktiv.

Auch hier ergaben sich für die hydrophilen Extrakte keine bemerkenswerten Ergebnisse. Die weitergehenden Untersuchungen wurden mit *S. kunthianum* durchgeführt. Von der sicherlich ebenfalls phytochemisch interessanten *M. foetida* lag nicht genügend Untersuchungsmaterial vor.

**Tabelle 2.2:** *In-vitro*-Aktivität der lipophilen Extrakte (PE/EtOAc 1:1 [V/V]) von Heilpflanzen aus Uganda gegen *Plasmodium falciparum*.

Pflanzenfamilie/Art	Pflanzenteil	IC <sub>50</sub> -Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	
		PoW	Dd2
Acanthaceae			
<i>Justicia betonica</i> L.	Blätter	22.4	n.b.
Asteraceae			
<i>Aspilia africana</i> (PERS.) CD ADAMS	Blätter	30.3	n.b.
<i>Vernonia amygdalina</i> DEL.	Wurzeln	19.0	n.b.
Bignoniaceae			
<i>Stereospermum kunthianum</i> CHAM.	Wurzelrinde	7.0	16.8
Cucurbitaceae			
<i>Momordica foetida</i> SCHUMACH.	Blätter	7.3	13.0
Fabaceae			
<i>Crotalaria laburnifolia</i> L.	Blätter	29.3	42.1
	Zweigrinde	19.5	36.4
Lamiaceae			
<i>Hoslundia opposita</i> VAHL.	Blätter	36.4	n.b.
Mimosaceae			
<i>Albizia coriaria</i> WELS. EX OLIV.	Stammrinde	n.b.	» 50

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten

n.b.: nicht bestimmt

#### 2.1.4 Untersuchte Heilpflanzen aus Ghana

Aus Ghana stammten acht Heilpflanzen, die vor allem aufgrund der Aussagen von Informanten vor Ort ausgesucht wurden. Als besonders aktiv erwiesen sich Extrakte von *Microglossa pyrifolia* (LAM.) KUNTZE, Asteraceae, (IC<sub>50</sub>-Werte: 8.3 bis 13.1  $\mu\text{g/ml}$ ). Die phytochemische Aufarbeitung der Kraut- und Wurzeldrogen wurde von Frau Inga Köhler übernommen (Köhler et al., 2002).

Da bei den vorangegangenen Untersuchungen der Blätter von *Andira inermis* aus Panama interessante Naturstoffe isoliert werden konnten, erschien es besonders lohnenswert, weiteres Pflanzenmaterial zu beschaffen. Heimisch ist dieser meist zu Zierzwecken genutzte Baum in Mittel- und Südamerika, doch findet sich diese Pflanzenart auch in Westafrika, so dass für weitere Untersuchungen Material aus Ghana zur Verfügung stand.

## 2.2 Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen TEIL I: Traditionelle Heilpflanzen

### 2.2.1 Phytochemische Untersuchung von *Andira inermis*

*Andira inermis* (W. WRIGHT) H.B.K., Fabaceae (Papilionidae, Abb. 2.1), ist ein bis zu 35 m hoher Baum mit einer dichten ausladenden Krone. Die für die Pflanzenfamilie typischen gefiederten Blätter bestehen aus 7-15 Fiederblättchen (oval, 2.3-13 cm lang, 1.5-5 cm breit). Die Blüten (1-1.5 cm lang) sind purpurfarben und traubig angeordnet. Die Blütenstände (10-25 cm lang) überragen häufig die obersten Laubblätter. Die steinfruchtähnlichen, ovalen und einsamigen Hülsenfrüchte werden bis zu 6 cm lang und 2.5-5 cm breit. *A. inermis* kommt ursprünglich in den Höhenlagen der Westindischen Inseln, Südmexiko bis Panama, im Norden Südamerikas sowie in Brasilien vor. Aufgrund ihres vielseitigen Nutzens wurde sie auch in die Karibik, USA (Florida) und in Westafrika eingeführt (Flora of Panama: Annals of the Missouri Botanical Garden, Vol. 52, pp. 49-51). Das Holz ist sehr hart und findet Verwendung im Eisenbahn- und Schiffsbau sowie bei der Möbelproduktion. Als schattenspendender Baum wird *A. inermis* häufig als Zierpflanze in Gärten und Parks angepflanzt (Navarrete, 1996). Die frische Rinde hat eine schleimige Konsistenz und schmeckt bitter. Die getrocknete Droge, gepulvert oder als Dekoktum (5-10 g/500 ml Wasser), wird als Wurm- und Fiebermittel eingesetzt und wirkt zudem abführend. So wird z. B. in Brasilien die getrocknete Rinde (Kinder 0.6 g, Erwachsene 3 g), die in gesüßtem Wasser oder in Milch gekocht wird, eingenommen. Die gepulverte Rinde soll außerdem sehr effektiv bei Wechselfieber sein. Die Samen werden ebenfalls genutzt (Morton, 1981).



**Abbildung 2.1:** Links: *Andira inermis* (WRIGHT) H.B.K., Fabaceae. Mitte: Blütenstand von *A. inermis*. Rechts: getrocknete Zweige und Blätter.

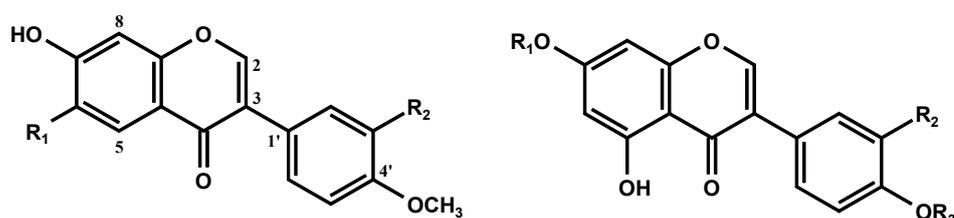
Je nach Region sind verschiedene Bezeichnungen in Gebrauch. Aufgrund der Ähnlichkeit mit den Früchten von *Terminalia catappa* L., Combretaceae, dem indischen Mandelbaum, der auch als Strandmandel bezeichnet wird, trägt *A. inermis* in El Salvador den Namen „almendro de río“ oder „river almond“ (*span.*, *engl.*) Flußmandelbaum). Als weitere Namen sind „Cabbage tree“ (*engl.*) Kohlbaum), „Guacamayo“ oder „False Mahogany“ (*engl.*) falscher Mahagonibaum) zu nennen (Hirschhorn, 1981; Morton, 1981; Navarrete, 1996).

Phytochemische Untersuchungen verschiedener Pflanzenteile von *A. inermis* zeigten, dass vornehmlich Isoflavone und verwandte Verbindungen, wie z. B. Pterocarpane, sowie  $\beta$ -Sitosterol und Stigmasterol enthalten sind (Chapman & Hall, 1994; Cocker et al., 1962; Da Silva et al., 2000; Lock de Ugaz et al., 1991).

Im Rahmen der Untersuchungen zeigten die Extrakte aus den Zweigen (IC<sub>50</sub>-Werte: 82.0 µg/ml [PoW], 108.7 µg/ml [Dd2]) und Blättern (IC<sub>50</sub>-Werte: 82.0 µg/ml [PoW], 108.7 µg/ml [Dd2]) von *A. inermis* eine moderate *in-vitro*-Aktivität. Für die weiteren Untersuchungen standen jeweils die Blatt- und Zweigdrogen zweier Chargen aus Panama und Ghana zur Verfügung. Durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung der einzelnen Extrakte konnten Vertreter verschiedener Naturstoffklassen (Isoflavone, Flavonoide, 2-Arylbenzofurane, Pterocarpane u. a.) aus den aktiven Fraktionen (Angabe der IC<sub>50</sub>-Werte in Kap. 5.5.1) isoliert werden. Im folgenden Abschnitt soll zunächst ausschließlich auf die Strukturaufklärung der Naturstoffe und damit auf das phytochemische Spektrum von *A. inermis* eingegangen werden, bevor die biologischen Aktivitäten der einzelnen Verbindungen behandelt werden. Am Ende dieses Kapitels sind die isolierten Naturstoffe in Tabelle 2.7 (Seite 53) nochmals zusammengefaßt.

### 2.2.1.1 Strukturaufklärung der Isoflavone 1-7

Aus drei der untersuchten Extrakte der Zweigrinde und den Blättern von *A. inermis* konnten Isoflavone isoliert werden (Kap. 5.5.1.1, 5.5.1.2, 5.5.1.3). Die Strukturen wurden anhand von EI-MS- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren aufgeklärt. Im Folgenden werden die einzelnen Verbindungen behandelt, wobei zunächst genauer auf die spektroskopischen Eigenschaften der Stoffklasse eingegangen wird und später bei den Folgesubstanzen nur noch die speziellen Merkmale erläutert werden.



Formononetin (1): R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H  
 Calycosin (2): R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH  
 Afromosin (7): R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = H

Genistein (3): R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H  
 Biochanin A (4): R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>  
 Prunetin (5): R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H  
 Pratensein (6): R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>

Abbildung 2.2: Strukturen der aus *Andira inermis* isolierten Isoflavone 1-7.

### Strukturaufklärung von Formononetin (1)

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte Signale für die Protonen einer Methoxygruppe bei δ 3.83 ppm (3H, s) und für ein isoliertes Proton bei δ 8.15 ppm (1H, s), dass die für Isoflavone typische Tieffeld-Verschiebung des H-2 zeigte. Drei weitere Signale bei δ 8.06 ppm (1H, d, J = 8.8 Hz), δ 6.95 ppm (1H, dd, J = 2.2 und 8.8 Hz) und δ 6.86 ppm (1H, d, J = 2.2 Hz) waren aufgrund ihres Aufspaltungsmusters für einen 1,2,4-trisubstituierten Aromaten charakteristisch und wurden H-5, H-6 und H-8 des A-Ringes zugeordnet. Desweiteren konnte man die Signale eines AA'BB'-Systems bei δ 6.98 ppm (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3'/5') und δ 7.47 ppm (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2'/6') einem *para*-substituierten B-Ring des Isoflavons zuordnen. Die Position der Methoxygruppe an C-4' wurde durch NOE-Experimente

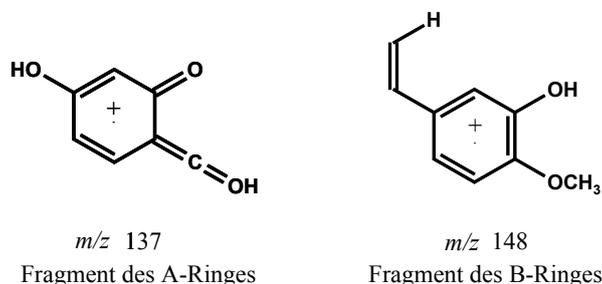
nachgewiesen.

Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  268. Dieser bestätigte die Annahme, dass es sich bei Verbindung **1** um 7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavon (Formononetin, Abb. 2.2) handelte. Dieser in Fabaceen häufig vorkommende Naturstoff wurde schon in früheren Arbeiten von Lock de Ugaz et al. (1991) für *A. inermis* beschrieben.

### Strukturaufklärung von Calycosin (**2**)

Laut  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum lag auch hier ein Isoflavon vor ( $\delta$  8.15 ppm, 1H, s, H-2). Die Signale für den A-Ring ( $\delta$  8.07 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-5,  $\delta$  7.00 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2.2$  und 8.8 Hz, H-6,  $\delta$  6.91 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.2$  Hz, H-8) sowie die Verschiebung der Methoxygruppe ( $\delta$  3.88 ppm, 3H, *s*, 4'-OCH<sub>3</sub>) ähnelten denen von **1**. Drei weitere Signale zeigten das Aufspaltungsmuster eines 1,2,4-trisubstituierten Aromaten ( $\delta$  7.17 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.1$  Hz, H-2',  $\delta$  7.07 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2.1$  und 8.3 Hz, H-6',  $\delta$  6.98 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.3$  Hz, H-5').

Das EI-Massenspektrum wies einen Molekülionpeak bei  $m/z$  284 auf, so dass **2** ein Sauerstoffatom mehr im Molekül besitzen mußte als **1**. Das Fragment bei  $m/z$  269  $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$  deutete auf den Verlust einer Methylgruppe hin. Außerdem waren drei charakteristische Fragmente bei  $m/z$  241  $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{CO}]^+$  sowie bei  $m/z$  148 und  $m/z$  137 erkennbar. Da die Fragmentationsmechanismen von Isoflavonen bekannt sind (Mabry and Markham 1975), ließen sich den beiden genannten Massen eindeutig Strukturen zuordnen (Abb. 2.3).



**Abbildung 2.3:** Mesomere Grenzstrukturen nach Fragmentierung am Beispiel von Calycosin (**2**).

Anhand dieser Daten konnte **2** als 3',7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon (Calycosin, Abb. 2.2) identifiziert werden. Durch Vergleich mit Literaturdaten (Kobayashi et al., 1985) wurde dies bestätigt. Die Position der Methoxygruppe an C-3' wurde anhand von Literaturdaten (Tahara et al., 1984) ausgeschlossen. Ebenso deckten sich die Signaldaten für Ring B mit denen von Pratensein (**6**). Calycosin (**2**) konnte zum ersten Mal aus einem Pflanzenteil von *A. inermis* isoliert werden.

### Strukturaufklärung von Genistein (3)

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **3** zeigte wiederum das Signal für ein an C-2 gebundenes Proton ( $\delta$  8.16 ppm, 1H, *s*) eines Isoflavons und zwei aromatische Protonen bei  $\delta$  6.32 ppm und  $\delta$  6.47 ppm (jeweils 1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz), letztere konnten den in *meta*-Stellung stehenden Protonen H-6 und H-8 des A-Ringes zugeordnet werden. Wie schon bei **1** waren die Signale eines AA'BB'-Systems bei  $\delta$  6.91 ppm (2H, *d*,  $J = 8.6$  Hz, H-3'/5') und  $\delta$  7.46 ppm (2H, *d*,  $J = 8.6$  Hz, H-2'/6'), charakteristisch für den *para*-disubstituierten B-Ring, vorhanden. Es gab keinen Hinweis auf im Molekül enthaltene Methoxygruppen. Das Singulett bei  $\delta$  13.02 ppm konnte der freien Hydroxygruppe an C-5 zugeordnet werden. Diese Verschiebung ist typisch für das Vorhandensein von freien Hydroxygruppen, die eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe ausbilden können. Somit konnte für **3** die Struktur eines 4',5,7-trihydroxylierten Isoflavons postuliert werden.

Zur Bestätigung der Struktur wurde ein EI-Massenspektrum aufgenommen. Der Molekülionpeak lag bei  $m/z$  270. Auch hier ließen sich die charakteristischen Hauptfragmente, diesmal bei  $m/z$  153 und  $m/z$  118, nachweisen.

Durch zusätzlichen Vergleich mit publizierten Daten (Asres et al., 1985) konnte **3** endgültig als 4',5,7-Trihydroxyisoflavin (Genistein, Abb. 2.2) identifiziert werden, welches auch schon vorher aus der Rinde von *A. inermis* isoliert werden konnte (Lock de Ugaz et al., 1991).

### Strukturaufklärung von Biochanin A (4)

Die Protonensignale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum waren denen von **3** sehr ähnlich, so dass man davon ausgehen konnte, dass es sich bei **4** um ein Genisteinderivat handelte. Tatsächlich unterschieden sich die Verschiebungen im A-Ring des Isoflavons nur sehr geringfügig ( $\delta$  6.35 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.1$  Hz, H-6,  $\delta$  6.45 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.1$  Hz, H-8,  $\delta$  13.00 ppm, 1H, *s*, 5-OH). Im B-Ring wichen die Werte um etwa 0.1 ppm ab ( $\delta$  7.00 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.7$  Hz, H-3'/5',  $\delta$  7.55 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.7$  Hz, H-2'/6'). Zusätzlich sah man im Spektrum das Signal der Protonen einer Methoxygruppe bei  $\delta$  3.84 ppm (3H, *s*). Die Verschiebung der Signale des B-Ringes wies auf eine Methoxygruppe am C-4' hin.

Durch ein EI-Massenspektrum, das einen Molekülionpeak von  $m/z$  284 aufwies, konnte anhand der entsprechenden Fragmente (s. a. Abb. 2.3) bestätigt werden, dass sich die Methoxygruppe tatsächlich im B-Ring befand ( $m/z$  153 [Ring A] und  $m/z$  132 [Ring B]). Über den spektroskopischen Datenvergleich mit Asres et al. (1985) und Talukdar et al. (2000) konnte die Struktur von **4** eindeutig als 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavin (Biochanin A, Abb. 2.2) aufgeklärt werden. In den Zweigen wie auch im Holz von *A. inermis* war dieses Isoflavonderivat schon nachgewiesen worden (Cocker et al., 1962; Lock de Ugaz et al., 1991).

### Strukturaufklärung von Prunetin (5)

Auch die Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **5** wiesen auf ein methyliertes Derivat des Genisteins (**3**) hin. Das Singulett der Methoxygruppe lag bei  $\delta$  3.93 ppm. Diesmal konnten leichte Abweichungen bei den Protonensignalen des A-Ringes beobachtet werden ( $\delta$  6.36

ppm, 1H, *d*,  $J = 2.3$  Hz, H-6,  $\delta$  6.55 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.3$  Hz, H-8), während die des B-Ringes unverändert waren. Somit konnte das Vorliegen eines 7-methoxylierten Isoflavons postuliert werden.

Das EI-Massenspektrum zeigte erneut einen Molekülionpeak von  $m/z$  284, die Hauptfragmente der A- und B-Ringe lagen bei  $m/z$  167 bzw.  $m/z$  118. Da die Hydroxygruppe an C-5 frei vorlag ( $\delta$  12.99 ppm, 1H, *s*), konnte folglich die Methoxygruppe nur an C-7 substituiert sein.

Die Struktur von 4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavon (Prunetin, Abb. 2.2) konnte zusätzlich durch Vergleich mit Literaturdaten von Talukdar et al. (2000) bestätigt werden. Aus *A. inermis* ist dieser Naturstoff das erste Mal isoliert worden.

### Strukturaufklärung von Pratensein (6)

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte Signale für die Protonen einer Methoxygruppe bei  $\delta$  3.86 ppm (3H, *s*) und eines isolierten Protons bei  $\delta$  8.17 ppm (1H, *s*, H-2). Zwei weitere Signale lagen bei  $\delta$  6.29 ppm (1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz) und 6.43 ppm (1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz), die den Protonen an C-6 und C-8 zuzuordnen waren. Ebenfalls war das Signal für die chelatisierte 5-OH-Gruppe ( $\delta$  13.00 ppm, 1H, *s*) erkennbar. Die weiteren drei Signale zeigten das Aufspaltungsmuster eines 1,2,4-trisubstituierten Aromaten ( $\delta$  7.00 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.3$  Hz, H-5',  $\delta$  7.05 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2.1$  und 8.3 Hz, H-6',  $\delta$  7.13 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.1$  Hz, H-2'). Durch den Vergleich mit Literaturdaten (Asres et al., 1985) konnte für **6** die Struktur des 4'-Methoxy-3',5,7-trihydroxyisoflavons (Pratensein, Abb. 2.2) bestätigt werden.

Das EI-Massenspektrum unterstützte dieses Ergebnis mit dem Auftreten der Hauptfragmente bei  $m/z$  153 für den Ring A und bei  $m/z$  148 für den B-Ring. Der Molekülionpeak lag bei  $m/z$  300. Auch dieses Isoflavon konnte erstmals aus *A. inermis* isoliert werden.

### Strukturaufklärung von Afrormosin (7)

Neben den zuvor besprochenen Isoflavonen, die sich entweder durch das Fehlen (z. B. Formononetin, **1**) bzw. das Vorhandensein (z. B. Genistein, **3**) einer 5-OH-Gruppe auszeichneten, konnte zusätzlich Verbindung **7** isoliert werden. Diese zeigte im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die schon bekannten Signale für einen *para*-disubstituierten B-Ring und das Proton an C-2 ( $\delta$  6.98 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-3'/5',  $\delta$  7.57 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-2'/6',  $\delta$  8.18 ppm, 1H, *s*, H-2). Zusätzlich lagen im Tieffeld die Signale von zwei isolierten aromatischen Protonen bei  $\delta$  6.97 ppm (*s*, H-8) und 7.56 ppm (*s*, H-5) vor, die im A-Ring *para*-ständig angeordnet sein mußten. Hinzu kamen die Signale für die Protonen zweier Methoxygruppen bei  $\delta$  3.83 ppm und  $\delta$  3.97 ppm (jeweils 3H, *s*).

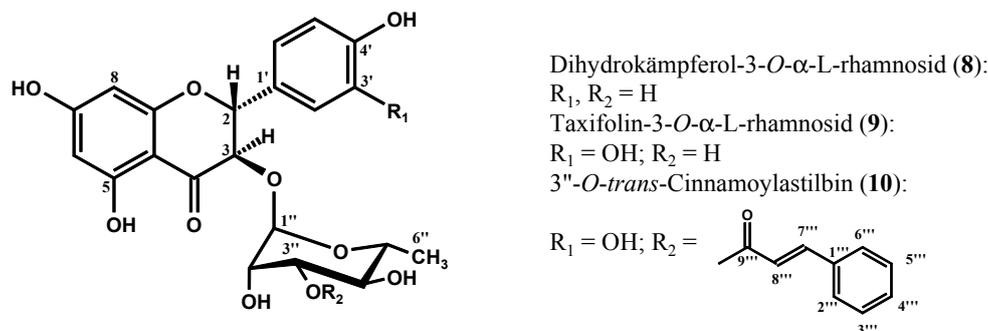
Das EI-Massenspektrum bestätigte die Annahme, dass es sich bei Verbindung **7** um ein Isoflavon mit je zwei Methoxygruppen und einer Hydroxygruppe handelte. Der Molekülionpeak lag bei  $m/z$  298. Auch die Abspaltung von Methyl- bzw. Methoxygruppen war anhand der Fragmente bei  $m/z$  283  $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$  und  $m/z$  267  $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$  erkennbar. Aufgrund der Verschiebung der Protonen im B-Ring und der Lage der Methoxygruppe bei  $\delta$  3.83 ppm (s. a. Biochanin A, **4**), konnte die Position der einen Methoxygruppe dem C-4' zugeordnet werden. Der eindeutige Nachweis der Positionen der Methoxygruppen erfolgte durch den Vergleich mit Literaturdaten. So konnte 4',7-Dimethoxy-6-hydroxyisoflavon (Alfalon) durch Vergleich mit Daten von Kobayashi et al. (1988) ausgeschlossen und **7** als

4',6-Dimethoxy-7-hydroxyisoflavon (Afrormosin, Abb. 2.2) identifiziert werden (Caballero und Smith, 1986). Afrormosin wurde ebenfalls bisher nicht aus *A. inermis* isoliert.

Während die Isoflavone **1-6** sowohl in der Zweigdroge aus Panama als auch in den Zweigen, die in Ghana gesammelt wurden, nachgewiesen bzw. isoliert werden konnten, fand sich Afrormosin (**7**) nur in den Blättern der panamaischen Charge. Aus dem Blattextrakt von *A. inermis* aus Panama konnten außerdem Formononetin (**1**), Calycosin (**2**) und Prunetin (**5**) isoliert werden.

### 2.2.1.2 Strukturaufklärung der Flavanonolglykoside **8-10**

Aus der  $\text{CHCl}_3$ -Fraktion des methanolischen Blattextraktes (Panama) konnten aus Fraktion 4 die Flavanonolrhamnoside **8** und **9** isoliert werden, während **10** aus Fraktion 3 gewonnen wurde (s. Kap. 5.5.1.2). Die Strukturaufklärung erfolgte anhand von  $^1\text{H-NMR}$ -, EIMS- und FAB-MS-Spektren, sowie im Fall von Verbindung **10** zusätzlich durch  $^{13}\text{C-NMR}$ - und HMBC-Messungen.



**Abbildung 2.4:** Strukturen der aus *Andira inermis* isolierten Flavanonolglykoside **8-10** (relative Konfiguration).

### Strukturaufklärung von Dihydrokämpferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosid (**8**)

Aus dem UV-Spektrum ( $\lambda_{max}$  [nm]: 201, 224 [Schulter], 292) war zu erkennen, dass es sich bei Verbindung **8** um ein Flavonoid handeln mußte. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte zudem die typischen Kopplungsmuster der Flavonoide im aromatischen Bereich und die Signale bei  $\delta$  3.32-4.22 ppm deuteten auf einen Zuckeranteil hin.

Im (-)-FAB-Massenspektrum war ein Peak bei  $m/z$  433 für das Ion  $[\text{M-H}]^-$  erkennbar. Das EI-MS-Spektrum zeigte hingegen einen Peak bei  $m/z$  270. Aus der Massedifferenz von 164 konnte man auf die Abspaltung eines Desoxyhexoserestes schließen.

Tatsächlich zeigte das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Dublett bei  $\delta$  1.14 ppm (3H, *d*,  $J = 6.2$  Hz), welches charakteristisch für die Methylgruppe des C-6'' einer Rhamnose ist. Das anomere Proton lag bei  $\delta$  4.01 ppm (1H, *brs*). Während die Protonen des A-Ringes des Aglykons *meta*-ständig zueinander waren ( $\delta$  5.98 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz, H-6,  $\delta$  6.00 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz, H-8), lag der B-Ring *para*-substituiert vor ( $\delta$  6.91 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.5$  Hz, H-3'/5',  $\delta$  7.43 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.5$  Hz, H-2'/6'). Schließlich sah man zusätzlich zwei Dubletts bei  $\delta$  4.71 ppm und 5.25 ppm mit einer Kopplungskonstante von  $J = 10.8$  Hz, die charakteristisch für eine *trans*-Konfiguration der zwei Protonen an C-3 und C-2 bei

Flavanonolen ist. Da keine Signale für Methoxygruppen vorhanden waren, handelte es sich bei dem Aglykon folglich um 4',5,7-Trihydroxyflavanonol (Dihydrokämpferol). Durch Vergleich dieser spektroskopischen Daten mit publizierten Daten (Reisch et al., 1984) konnte die Struktur von **8** als Dihydrokämpferol-3-*O*-rhamnosid (Engelitin, Abb. 2.4) identifiziert werden. Dieses Glykosid wurde bisher nicht für *A. inermis* beschrieben.

### Strukturaufklärung von Taxifolin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosid (**9**)

Verbindung **9** zeigte in den chemischen Verschiebungen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum keine großen Unterschiede zu **8**. Anstelle des *para*-substituierten B-Ringes lag diesmal ein 1,3,4-trisubstituierter Aromat vor ( $\delta$  6.86 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.2$  Hz, H-5',  $\delta$  6.91 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2.1$  und  $8.2$  Hz, H-6',  $\delta$  7.06 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.1$  Hz, H-2'). Auch in diesem Fall waren keine Methoxygruppen im Molekül vorhanden. Das (-)-FAB-Massenspektrum zeigte einen Peak bei  $m/z$  449 für das Ion  $[\text{M-H}]^-$ . Das EIMS-Spektrum zeigte einen Peak bei  $m/z$  286, so dass das Flavanonolaglykon ein Sauerstoffatom mehr besaß und als 3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanonol (Taxifolin, Abb. 2.4) identifiziert werden konnte. Astilbin ist der Trivialname des 3-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnosids und auch hier konnte durch einen Literaturdatenvergleich (Tschesche et al., 1979) die Struktur endgültig abgesichert werden. Auch dieser Naturstoff wurde bisher nicht für *A. inermis* beschrieben.

### Strukturaufklärung von 3''-*O*-*trans*-Cinnamoylastilbin (**10**)

Das (-)-FAB-Massenspektrum von Verbindung **10** zeigte einen Ionpeak bei  $m/z$  579  $[\text{M-H}]^-$ . Zusammen mit den Informationen aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Tab. 2.3) konnte so auf die Summenformel  $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$  geschlossen werden. Durch die charakteristischen Signale für eine Flavanonol-Partialstruktur ( $\delta$  5.24 ppm, 1H, *d*,  $J = 10.7$  Hz, H-2,  $\delta$  4.72 ppm, 1H, *d*,  $J = 10.7$  Hz, H-3) und den direkten Datenvergleich mit Engelitin (**8**) und Astilbin (**9**) konnte man auf Taxifolin als Aglykon schließen. Auch hier war eine L-Rhamnose, charakterisiert durch das Dublett bei  $\delta$  1.22 ppm (3H,  $J = 6.2$  Hz, H-6'') als Zuckeranteil nachweisbar. Zusätzlich traten vier Signale im Tieffeldbereich des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums auf. Zum einen je ein Multiplett bei  $\delta$  7.44 und 7.67 ppm (3H und 2H), die einen unsubstituierten Phenylring charakterisierten, sowie Signale für zwei miteinander koppelnde olefinische Protonen bei  $\delta$  6.53 ppm (1H, *d*,  $J = 16.0$  Hz) und 7.71 ppm (1H, *d*,  $J = 16.0$  Hz). Die große Kopplung deutete auf eine *trans*-Doppelbindung hin. In Verbindung mit dem im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Tab. 2.3) erkennbaren Signal bei  $\delta$  168 ppm für das C-Atom einer Carbonylgruppe ließen diese Daten vermuten, dass zusätzlich zum Flavanonolrhamnosid-Gerüst eine Zimtsäure im Molekül vorhanden war. Die Verknüpfung der Rhamnopyranosid-Einheit über die Hydroxygruppe an C-3 des Flavonoids konnte aus der HMBC-Messung (Tab. 2.3) abgeleitet werden. Das Doppeldublett des H-3'' des Zuckers ( $\delta$  5.12 ppm,  $J = 3.0$  und  $9.7$  Hz) war tieffeldverschoben und zeigte somit die Position der Esterbindung mit dem Zimtsäurerest an. So ergab sich die Struktur von 3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanonol-3-*O*-(3''-*O*-*trans*-cinnamoyl)-rhamnopyranosid.

Verbindung **10** ist bisher nicht als Naturstoff beschrieben worden. Da für das Rhamnosid schon ein Trivialname existiert, wird für **10** der Name 3''-*O*-*trans*-Cinnamoylastilbin (Abb. 2.4) vorgeschlagen.

**Tabelle 2.3:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten [400 MHz, AcetonD<sub>6</sub>,  $\delta$  (ppm)],  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)] sowie HMBC-Korrelationen von 3''-*O*-*trans*-Cinnamoylastilbin (**10**).

Position	<b>10</b>		
	$\delta_{\text{H}}^a$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC-Korrelationen
2	5.24 (1H, <i>d</i> , 10.7)	83	1', 3, 4, 6'
3	4.72 (1H, <i>d</i> , 10.7)	78	1', 1'', 2, 4
4		195	
4a		102	
5		162	
6	5.97 (1H, <i>d</i> , 2.0)	96	4a, 5, 7
7		164	
8	5.99 (1H, <i>d</i> , 2.0)	97	5, 7
8a		162	
1'		127	
2'	7.10 (1H, <i>d</i> , 1.9)	115	4', 6'
3'		146	
4'		147	
5'	6.85 (1H, <i>d</i> , 8.1)	116	1', 3'
6'	6.92 (1H, <i>dd</i> , 1.9, 8.1)	119	4'
1''	4.12 (1H, <i>d</i> , 1.3)	101	3, 3'', 5''
2''	3.48 (1H, <i>dd</i> , 1.3, 3.0)	69	
3''	5.12 (1H, <i>dd</i> , 3.0, 9.7)	74	
4''	3.71 (1H, <i>t</i> , 9.7)	70	
5''	4.41 (1H, <i>dq</i> , 6.2, 9.7)	69.5	
6''	1.22 (3H, <i>d</i> , 6.2)	30	5''
1'''		134	
2''' und 6'''	7.67 (2H, <i>m</i> )	128	3''', 4''', 5'''
3''', 4''', und 5'''	7.44 (3H, <i>m</i> )	129	1''', 2''', 6'''
7'''	7.71 (1H, <i>d</i> , 16.0)	145	2''', 6''', 9'''
8'''	6.53 (1H, <i>d</i> , 16.0)	118	1'''
9'''		168	
OH-5	11.94 (1H, <i>s</i> )		

<sup>a</sup> Intensitäten, Kopplungsmuster und *J*-Werte (Hz) in Klammern

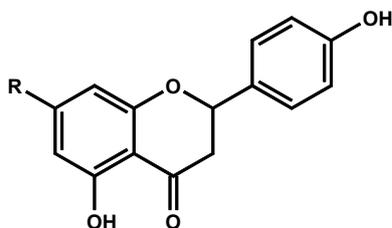
### 2.2.1.3 Strukturaufklärung der Flavanone 11-12

Während die Verbindung **11** aus den Zweigen von *A. inermis* isoliert werden konnte (Kap. 5.5.1.3), wurde **12** aus den Blättern gewonnen (Kap. 5.5.1.4). In beiden Fällen handelte es sich um Proben aus Ghana. Die Strukturen wurden mit Hilfe von EI-MS- und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aufgeklärt.

### Strukturaufklärung von Naringenin (11)

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **11** zeigte die typischen Kopplungsmuster der Flavonoide im aromatischen Bereich. So erkannte man die Signale für einen *para*-substituierten Aromaten ( $\delta$  6.89 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-3'/5',  $\delta$  7.39 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-2'/6') sowie für zwei *meta*-ständige Protonen ( $\delta$  5.95 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz, H-6,  $\delta$  5.96 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz, H-8). Aufgrund des für ein ABX-System typischen Kopplungsmusters konnte auf ein Flavanon geschlossen werden. Die beiden Doppeldoublets bei  $\delta$  2.73 ppm (1H, *dd*,  $J = 3.0$  und 17.0 Hz) und 3.19 ppm (1H, *dd*,  $J = 13.0$  und 17.0 Hz) zeigten jeweils eine geminale und eine vicinale Kopplung und waren somit den Protonen an C-3 zuzuordnen. Das Proton an C-2 war entsprechend seiner Lage im Molekül ins Tieffeld verschoben und lag bei  $\delta$  5.46 ppm (1H, *dd*,  $J = 3.0$  und 13.0 Hz).

In Kombination mit der Masse von  $m/z$  272 (EI-MS) und dem direkten Spektrenvergleich mit authentischem Naringenin (Roth) konnte Verbindung **11** eindeutig als 4',5,7-Trihydroxyflavanon (Abb. 2.5) identifiziert werden.



Naringenin (**11**): R = OH

Sakuranetin (**12**): R = OCH<sub>3</sub>

Abbildung 2.5: Strukturen der aus *Andira inermis* isolierten Flavanone **11-12**.

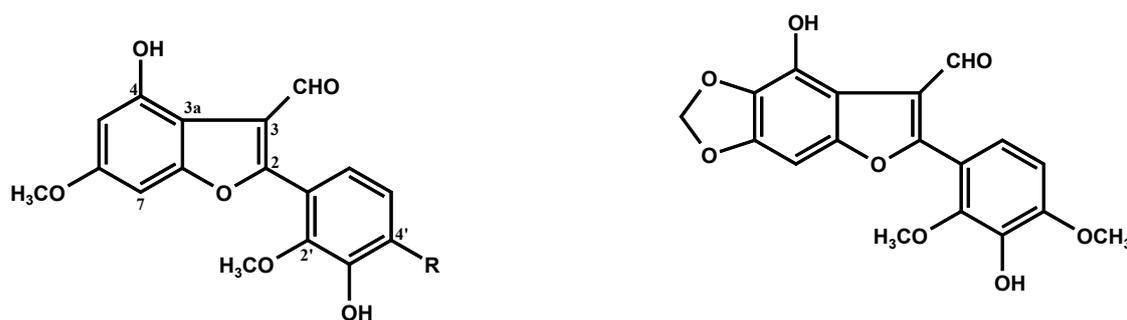
### Strukturaufklärung von Sakuranetin (12)

Da die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **11** und **12** beide in AcetonD<sub>6</sub> aufgenommen wurden, konnten die chemischen Verschiebungen direkt miteinander verglichen werden. Auch bei **12** lag ein Flavanon vor ( $\delta$  2.70 ppm, 1H, *dd*,  $J = 3.0$  und 17.0 Hz, H-3b,  $\delta$  3.22 ppm, 1H, *dd*,  $J = 13.0$  und 17.0 Hz, H-3a,  $\delta$  5.49 ppm, 1H, *dd*,  $J = 3.0$  und 13.0 Hz, H-2). Zusätzlich trat im Spektrum von Verbindung **12** ein Signal für eine Methoxygruppe auf ( $\delta$  3.85 ppm, 3H, *s*). Während sich die Werte für den B-Ring nicht unterschieden, trat eine leichte Tieffeldverschiebung von 0.1 ppm bei den Signalen für den A-Ring auf ( $\delta$  6.04 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.2$  Hz, H-6,  $\delta$  6.05 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.2$  Hz, H-8). Da am C-5 eine freie Hydroxygruppe, erkennbar an dem Signal bei  $\delta$  12.37 ppm (1H, *s*), vorlag, konnte davon ausgegangen werden, dass die Methoxygruppe in Position 7 stehen mußte.

So wurde für **12** die Struktur von 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavanon (Sakuranetin, Abb. 2.5) formuliert, welches mit der Masse von  $m/z$  286 (EI-MS) übereinstimmte (Hurabielle et al., 1982).

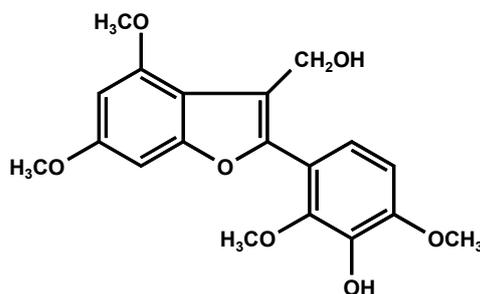
### 2.2.1.4 Strukturaufklärung der 2-Arylbenzofurane 13-16

Aus dem lipophilen Extrakt der Blätter von *A. inermis* aus Panama konnte die Verbindung **14** isoliert werden, während **13** und **15** aus dem methanolischen Extrakt der Blätter gewonnen wurden (Kap. 5.5.1.2). Verbindung **16** wurde aus der ghanaischen Blattdroge nach Extraktion mit MeOH und anschließendem Ausschütteln mit  $\text{CHCl}_3$  zusammen mit **13** und **14** isoliert (Kap. 5.5.1.4). Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe von EI-MS-, HR-MS-,  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sowie anhand von HMBC- und COSY-Messungen und NOE- bzw. NOESY-Experimenten.



Andinermal A (**13**): R =  $\text{OCH}_3$   
 Andinermal C (**15**): R = OH

Andinermal B (**14**)



Andinermol (**16**)

**Abbildung 2.6:** Strukturen der aus *Andira inermis* isolierten 2-Arylbenzofurane **13-16**.

### Strukturaufklärung von Andinermal A (**13**)

Das EI-Massenspektrum von **13** zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  344  $[\text{M}]^+$  und mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie wurde die Summenformel  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$  ermittelt. Anhand des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums (Tab. 2.4) konnte auf das Vorhandensein dreier Methoxygruppen ( $\delta$  56-61 ppm), einer Carbonylgruppe ( $\delta$  192 ppm), sowie 14 weiterer Kohlenstoffatome geschlossen werden. Sowohl die Daten aus dem  $^1\text{H}$ -NMR- (Abb. 2.7, Tab. 2.5) als auch aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigten große Ähnlichkeit mit publizierten Daten der 2-Arylbenzofuran-3-carbaldehyde Ebenfuran II und III (Halabalaki et al., 2000).

**Tabelle 2.4:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten [125 MHz, AcetonD<sub>6</sub>,  $\delta$  (ppm)] sowie HMBC- und NOESY-Korrelationen von Andinermol A (**13**) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten [100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  (ppm)] von Andinermol (**16**).

Position	<b>13</b>			<b>16</b>
	$\delta_{\text{C}}^a$	HMBC Korrelationen	NOESY Korrelationen	$\delta_{\text{C}}$
2	164			n.b.
3	119			116.6
3a	108			108.3 <sup>b</sup>
4	153			159.8 <sup>c</sup>
5	98	3a,4,5 <sup>d</sup> ,6,7	OCH <sub>3</sub> -6	94.3
6	162			159.2 <sup>c</sup>
7	88	3a,5,6,7 <sup>d</sup> ,7a	OCH <sub>3</sub> -6	88.7
7a	157			156.5 <sup>c</sup>
1'	115			n.b.
2'	146			148.5
3'	141			138.7
4'	152			153.2
5'	108	1',3',4',5' <sup>d</sup> ,6'	OCH <sub>3</sub> -4'	106.8 <sup>b</sup>
6'	122	2,2',4',6' <sup>d</sup>		121.7
CHO	192	3,3a,CHO <sup>d</sup>	OH-4	-
CH <sub>2</sub> OH	-			56.5
OCH <sub>3</sub> -4	-			56.3 <sup>e</sup>
OCH <sub>3</sub> -6	56	6,OCH <sub>3</sub> -6 <sup>d</sup>	5,7	55.8 <sup>e</sup>
OCH <sub>3</sub> -2'	61	2',OCH <sub>3</sub> -2' <sup>d</sup>		61.1
OCH <sub>3</sub> -4'	56	4',OCH <sub>3</sub> -4' <sup>d</sup>	5'	55.8 <sup>e</sup>
OH-4	-	3a, 4, 5, 6	CHO	-

<sup>a</sup> Werte abgeleitet aus HMBC-Messung

<sup>b</sup> Werte austauschbar

<sup>c</sup> Werte austauschbar

<sup>d</sup>  $^1J$ -Korrelation

<sup>e</sup> Werte austauschbar

n.b.: nicht bestimmt

Aus dem HMBC-Spektrum ( $^1J$ -Korrelation, Abb. 2.8 und 2.10, Tab. 2.4) war ersichtlich, dass das Signal der Carbonylgruppe bei  $\delta$  192 ppm mit dem Singulett bei  $\delta$  9.81 ppm aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum korrelierte. Dies deutete aufgrund der chemischen Verschiebung auf das Vorhandensein eines Carbaldehyds hin. Zusätzlich zeigte das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ein Signal bei  $\delta$  10.15 ppm (1H, *s*), welches dem Proton einer freien Hydroxygruppe zuzuordnen war, das durch Chelatisierungseffekte im Spektrum sichtbar wurde. Desweiteren waren die Signale für zwei in *meta*-Stellung stehende aromatische Protonen ( $\delta$  6.36 ppm, 1H, *d*,  $J = 1.9$  Hz,  $\delta$  6.72 ppm, 1H, *d*,  $J = 1.9$  Hz) zu erkennen, die den Wasserstoffatomen an C-5 und C-7 zugeordnet wurden sowie zwei *ortho*-koppelnde Protonen bei  $\delta$  6.99 ppm (1H, *d*,  $J = 8.6$  Hz, H-5') und 7.22 ppm (1H, *d*,  $J = 8.6$  Hz, H-6').

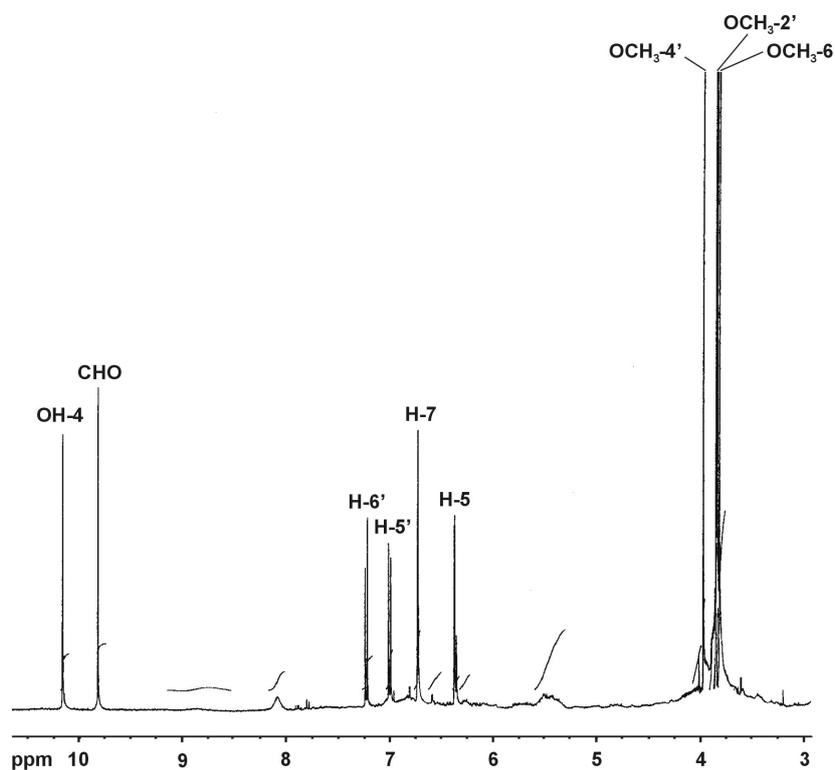


Abbildung 2.7:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Andinermal A (**13**, 400 MHz,  $\text{AcetonD}_6$ ).

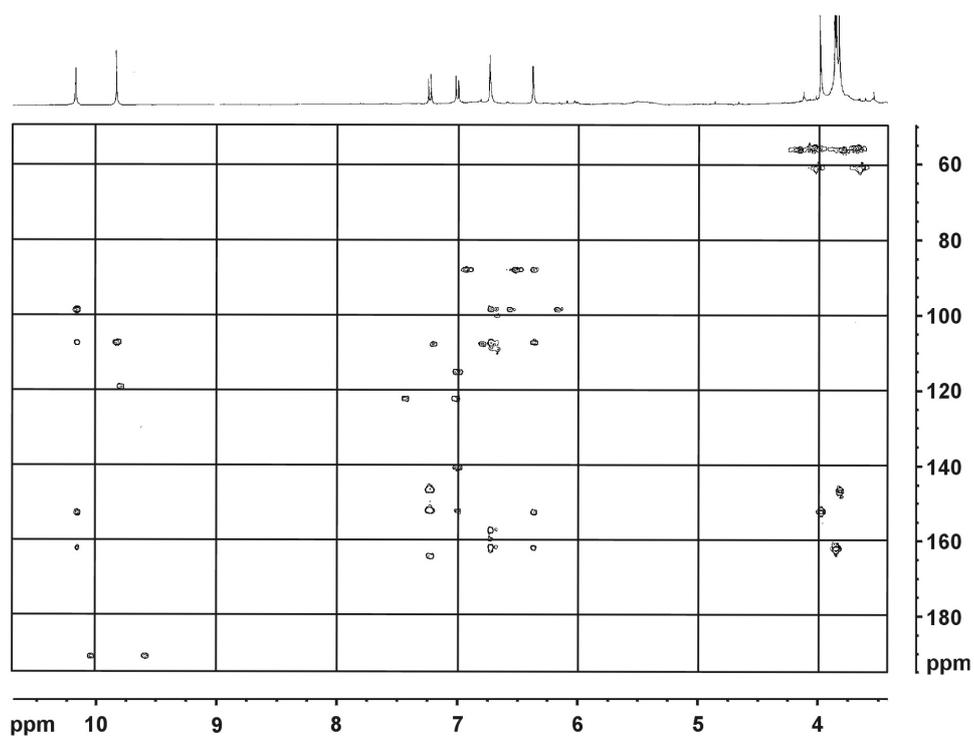


Abbildung 2.8: HMBC-Spektrum von Andinermal A (**13**, 125 MHz,  $\text{AcetonD}_6$ ).

Im HMBC-Spektrum verfügten das Proton der chelatisierten Hydroxygruppe, die Carbaldehydfunktion und beide *meta*-koppelnden Protonen über long-range-Korrelationen zu einem Kohlenstoffsignal bei  $\delta$  108 ppm, das dem C-3a von 2-Arylbenzofuran-3-carbaldehyden entsprach (Abb. 2.10 und Tab. 2.4). Die Positionen der drei Methoxygruppen ( $\delta$  3.82, 3.85 und 3.97 ppm, je 3H) konnten mit Hilfe von NOESY- und HMBC-Experimenten ermittelt werden. Das Singulett bei  $\delta$  3.85 ppm zeigte NOESY-Crosspeaks zu H-5 und H-7, genauso wie das Singulett bei  $\delta$  3.92 ppm zu H-5'.

**Tabelle 2.5:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten [400 MHz, AcetonD<sub>6</sub>,  $\delta$  (ppm), Intensitäten, Kopplungsmuster und *J*-Werte (Hz) in Klammern] von Andinermal A-C (**13** - **15**) und Andinermol (**16**).

Proton	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16<sup>a</sup></b>
5	6.36 (1H, <i>d</i> , 1.9)		6.36 (1H, <i>d</i> , 2.0)	6.38 (1H, <i>d</i> , 1.9)
7	6.72 (1H, <i>d</i> , 1.9)	6.76 (1H, <i>s</i> )	6.72 (1H, <i>d</i> , 2.0)	6.69 (1H, <i>d</i> , 1.9)
5'	6.99 (1H, <i>d</i> , 8.6)	6.99 (1H, <i>d</i> , 8.6)	6.86 (1H, <i>d</i> , 8.4)	6.75 (1H, <i>d</i> , 8.5)
6'	7.22 (1H, <i>d</i> , 8.6)	7.21 (1H, <i>d</i> , 8.6)	7.13 (1H, <i>d</i> , 8.4)	6.98 (1H, <i>d</i> , 8.5)
CHO	9.81 (1H, <i>s</i> )	9.78 (1H, <i>s</i> )	9.82 (1H, <i>s</i> )	
CH <sub>2</sub> OH				4.71 (2H, <i>d</i> , 7.0)
OCH <sub>3</sub> -4				3.98 (3H, <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub> -6	3.85 (3H, <i>s</i> )		3.85 (3H, <i>s</i> )	3.86 (3H, <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub> -2'	3.82 (3H, <i>s</i> )	3.81 (3H, <i>s</i> )	3.74 (3H, <i>s</i> )	3.71 (3H, <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub> -4'	3.97 (3H, <i>s</i> )	3.97 (3H, <i>s</i> )		3.95 (3H, <i>s</i> )
OH-4	10.15 (1H, <i>s</i> )	10.24 (1H, <i>s</i> )	10.16 (1H, <i>s</i> )	
OH-3'				5.95 (1H, <i>brs</i> )
CH <sub>2</sub> OH				3.24 (1H, <i>t</i> , 7.0)
-OCH <sub>2</sub> O-		6.03 (2H, <i>s</i> )		

<sup>a</sup> Verbindung **16** wurde in CDCl<sub>3</sub> vermessen

Im HMBC-Spektrum zeigte das Proton an C-6' eine Korrelation zu C-2' ( $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  61 ppm). Daraufhin konnte die Methoxygruppe ( $^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  3.82 ppm) aufgrund der bestehenden Korrelation zu C-2' eindeutig zugeordnet werden.

Anhand der Daten konnte **13** als 2-[2',4'-Dimethoxy-3'-hydroxyphenyl]-4-hydroxy-6-methoxy-benzofuran-3-carbaldehyd (Abb. 2.6) identifiziert werden. Diese Verbindung ist bisher nicht als Naturstoff beschrieben worden, so dass die Trivialbezeichnung Andinermal A vorgeschlagen wird.

### Strukturaufklärung von Andinermal B (14)

Für Verbindung **14** konnte die Summenformel C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub> bestimmt werden, das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  358 [M]<sup>+</sup>.

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.5) zeigten sich erneut die für die Stoffklasse charakteristischen Signale bei  $\delta$  9.78 ppm (1H, *s*, CHO) und 10.24 ppm (1H, *s*, 4-OH). Das Singulett

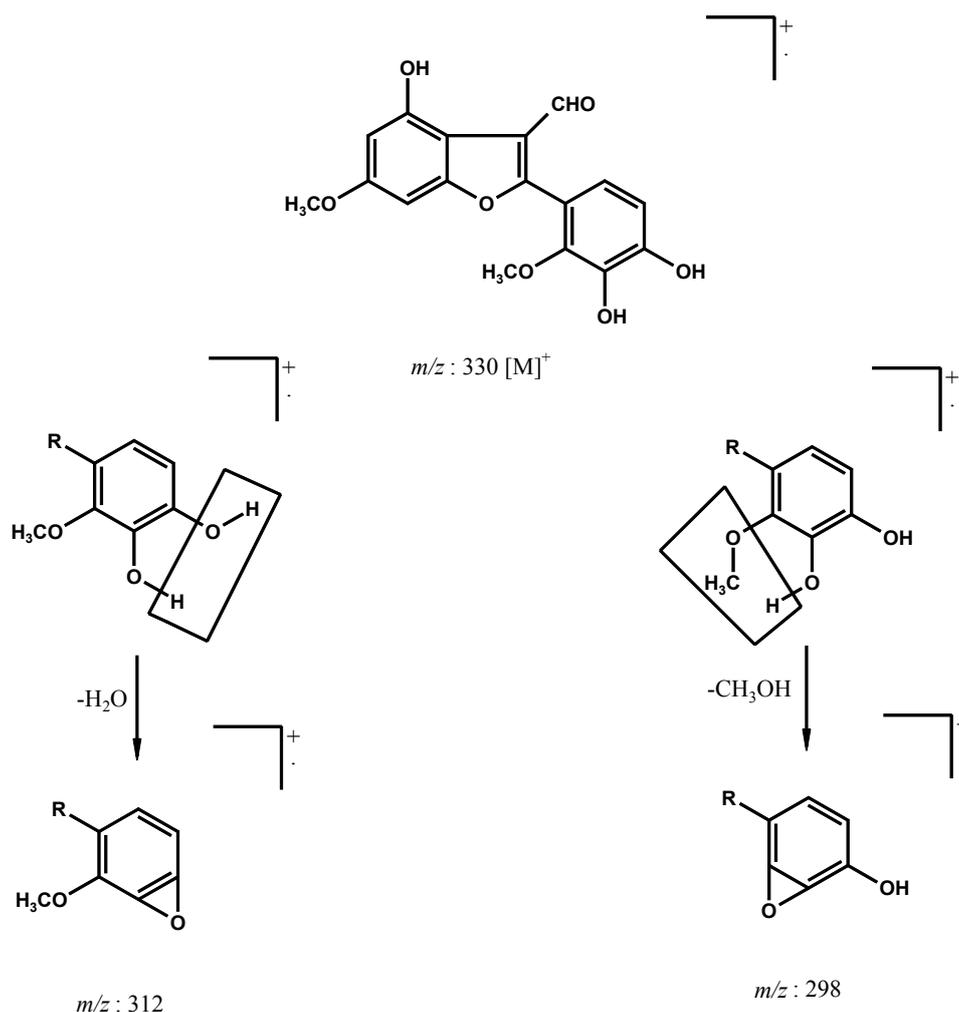
zweier Protonen bei  $\delta$  6.03 ppm indizierte das Vorhandensein einer Methylendioxygruppe. Zusätzlich erschien das Signal eines isolierten aromatischen Protons ( $\delta$  6.76 ppm, *s*), dessen chemische Verschiebung der von H-7 aus Verbindung **13** sehr ähnelte. Dieser Hinweis führte zu der Annahme, dass sich die Methylendioxygruppe zwischen C-5 und C-6 in Ring A befand, und nicht, wie ebenfalls denkbar, zwischen C-6 und C-7. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der übrigen aromatischen Protonen und der Methoxygruppen waren praktisch deckungsgleich mit denen von **13**, was auf ein identisches Substitutionsmuster in Ring B schließen ließ.

Verbindung **14** stellte somit 2-[2',4'-Dimethoxy-3'-hydroxyphenyl]-4-hydroxy-5,6-methylendioxy-benzofuran-3-carbaldehyd (Abb. 2.6) dar und erhielt als neuer Naturstoff den Namen Andinermal B.

### Strukturaufklärung von Andinermal C (**15**)

Das EI-Massenspektrum von **15** zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  330  $[M]^+$  und mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie wurde die Summenformel  $C_{17}H_{14}O_7$  ermittelt. Auch hier konnte aufgrund der zwei charakteristischen Signale im  $^1H$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.5) bei  $\delta$  9.82 ppm (1H, *s*, CHO) und 10.16 ppm (1H, *s*, 4-OH) auf die Stoffklasse der 2-Arylbenzofuran-3-carbaldehyde geschlossen werden. Während die Protonensignale für den Ring A identisch mit denen von **13** waren, konnte bei den *ortho*-ständigen Protonen von Ring B eine Verschiebung ins Hochfeld beobachtet werden ( $\delta$  6.86 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-5',  $\delta$  7.13 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-6'). Aufgrund der Massendifferenz von 14 sowie dem Fehlen des dritten Signals einer Methoxygruppe im  $^1H$ -NMR-Spektrum, mußte es sich bei **15** um ein demethyliertes Derivat von Andinermal A (**13**) handeln. Die Position der Methoxygruppe an C-6 konnte mittels NOE-Experimenten bestimmt werden: Einstrahlung in das Signal bei  $\delta$  3.85 ppm führte zu Signalvergrößerungen der Dubletts bei  $\delta$  6.36 ppm (H-5) und 6.72 ppm (H-7). Die zweite Methoxygruppe bei  $\delta$  3.74 ppm konnte sich nicht an C-4' befinden, da kein NOE-Effekt zu H-5' zu beobachten war. Außerdem wäre bei einem derartigen Substitutionsmuster keine große Differenz der Verschiebungen der aromatischen Protonen verglichen mit den anderen Verbindungen zu erwarten gewesen.

Um eine Methoxygruppe an C-3' auszuschließen, konnte das EI-Massenspektrum von **15** herangezogen werden, dessen Fragmentierungsmuster sich von dem der Substanzen **13** und **14** auf charakteristische Weise unterschied. Eine Wasserabspaltung (Massendifferenz von 18) und somit die Bildung eines Radikalions bei  $m/z$  312 war im Spektrum zu erkennen. Ausgehend vom Molekülradikalion finden sich mehrere konkurrierende Fragmentierungen. Voraussetzung für die Wasserabspaltung ist ein Wasserstoffatom in Nachbarschaft zur Hydroxygruppe. Dies wäre sowohl durch die Methoxygruppe als auch durch eine zweite Hydroxygruppe möglich, wobei die Wasserstoffübertragung zweier benachbarter Hydroxygruppen energetisch begünstigt und somit eine *ortho*-Stellung der freien Hydroxygruppen an C-3' und C-4' zu vermuten ist. Würde der Wasserstoff von der Methoxygruppe stammen, so hätte man diesen Effekt auch bei den anderen beiden Verbindungen **13** und **14** beobachten müssen. Die zwei Hauptfragmente bei  $m/z$  299 und 298 lassen sich zudem durch die Abspaltung einer Methoxygruppe (Massendifferenz von 31) und einer MeOH-Einheit (Massendifferenz von 32) erklären. Die Methoxygruppe an C-2' steht also nicht direkt für eine Wasserabspaltung zur Verfügung. Die mögliche Fragmentierung ist in Abbildung 2.9 dargestellt.

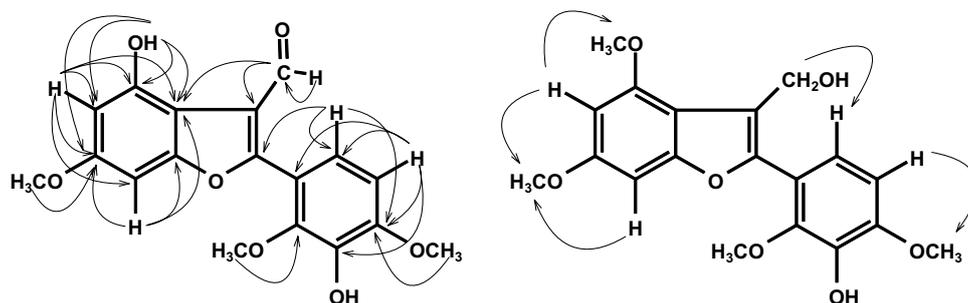


**Abbildung 2.9:** Charakteristische EI-MS-Fragmentierungsreaktionen von Andinermol C (**15**).

Somit konnte **15** eindeutig als das 4'-Demethylderivat von Andinermol A **13** identifiziert werden. Da auch diese Verbindung einen neuen Naturstoff darstellte, wurde entsprechend der anderen 2-Arylbenzofuran-3-carbaldehyde der Name Andinermol C vorgeschlagen (Abb. 2.6).

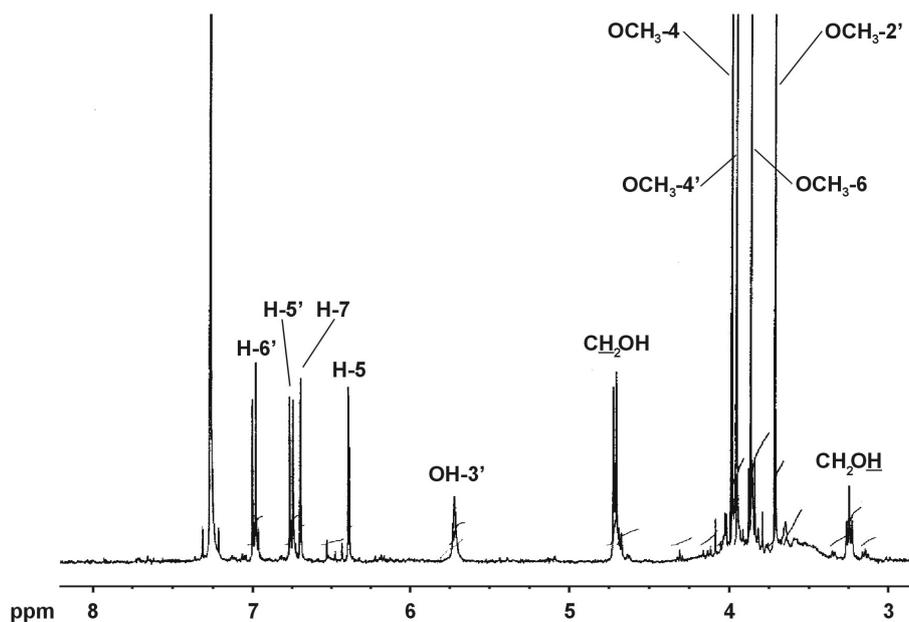
### Strukturaufklärung von Andinermol (**16**)

Das EI-Massenspektrum von **16** wies einen Molekülionpeak bei  $m/z$  360 auf. Das Fragment bei  $m/z$  342 deutete auf eine Wasserabspaltung hin. Die korrespondierende Summenformel ( $C_{19}H_{20}O_7$ ) wurde mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie ermittelt. Das  $^1H$ -NMR-Spektrum (Abb. 2.11, Tab. 2.5) zeigte die charakteristischen Signale zweier *metakoppelnder* Protonen ( $\delta$  6.38 ppm, 1H, *d*,  $J = 1.9$  Hz,  $\delta$  6.69 ppm, 1H, *d*,  $J = 1.9$  Hz), sowie zweier in *ortho*-Stellung stehender Protonen ( $\delta$  6.75 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.5$  Hz,  $\delta$  6.98 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.5$  Hz).



**Abbildung 2.10:** HMBC-Korrelationen von Andinermol A (**13**) und NOE-Korrelationen von Andinermol (**16**).

Insgesamt waren vier Methoxygruppen im Molekül vorhanden. Zusätzlich erkannte man das Signal für eine Hydroxymethylgruppe ( $\delta$  3.24 ppm, 2H, *brs*), das korrespondierende Kohlenstoffatom wies im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.4) eine Verschiebung von  $\delta$  56.5 ppm auf. Aufgrund der Ähnlichkeiten im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum wurde als Grundstruktur ebenfalls ein 2-Arylbenzofuran mit identischem Substitutionsmuster wie bei den Carbaldehyden **13** und **15** angenommen. Anstelle der Aldehydfunktion lag jedoch diesmal eine Hydroxymethylgruppe an C-3 vor. Die Daten waren zudem vergleichbar mit Ergebnissen für 2-[3',4'-Dimethoxyphenyl]-3-hydroxymethyl-7-methoxybenzofuran, hergestellt durch Reduktion aus dem entsprechenden 3-Formylderivat von Stomberg et al. (1997). Die Positionen der Methoxygruppen bei  $\delta$  3.86, 3.95 und 3.98 ppm (je 3H, *s*) konnten mit Hilfe von NOE-Experimenten geklärt werden.



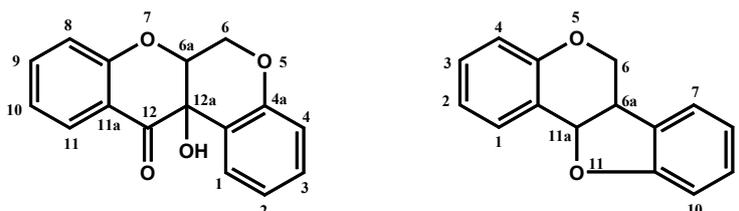
**Abbildung 2.11:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Andinermol (**16**, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

So führte die Einstrahlung bei  $\delta$  3.86 ppm zur Vergrößerung der Signale bei  $\delta$  6.38 (H-5) und 6.69 ppm (H-7). Die Singulets bei  $\delta$  3.95 und 3.98 ppm zeigten jeweils Korrelationen mit den Dubletts bei  $\delta$  6.75 (H-5') und 6.38 ppm (H-5). Die vierte Methoxygruppe wurde aufgrund der chemischen Verschiebung im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum ( $\delta$  61.1 ppm) und der Ähnlichkeit der Daten zu Andinermal A (**13**, Tab. 2.4) dem C-2' zugeordnet.

Abschließend wurde für Verbindung **16** die Struktur von 2-[2',4'-Dimethoxy-3'-hydroxyphenyl]-4,6-dimethoxy-3-hydroxymethyl-benzofuran (Abb. 2.6) formuliert. Da es sich um einen neuen Naturstoff handelt, wurde für **16** der Name Andinermol vorgeschlagen.

### 2.2.1.5 Strukturaufklärung der Pterocarpane 17-19

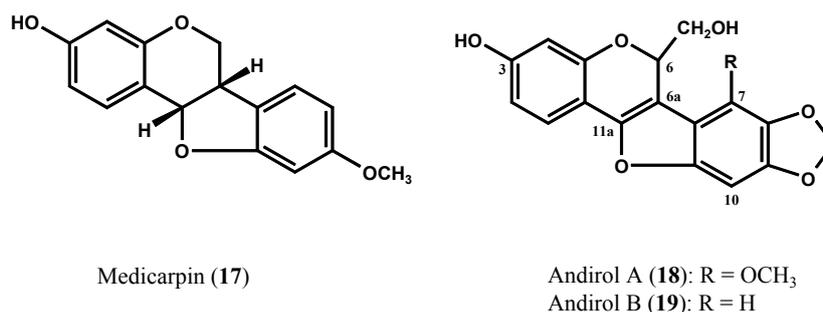
Aus dem lipophilen Extrakt der in Panama gesammelten Zweige von *A. inermis* konnte Verbindung **17** isoliert werden (Kap. 5.5.1.1). Während **18** aus beiden Blattdrogen gewonnen werden konnte, wurde **19** nur in geringer Menge ( $< 1$  mg) aus dem Blattextrakt von *A. inermis* aus Ghana erhalten (Kap. 5.5.1.2, 5.5.1.4). Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe von EI-MS-, HR-MS-,  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sowie COSY- und NOE-Messungen.



**Abbildung 2.12:** Grundgerüste von 12a-Hydroxyrotenoiden (links) und Pterocarpanen (rechts) mit der üblichen Zählweise (Markham und Mabry, 1975).

### Strukturaufklärung von Medicarpin (17)

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **17** zeigte Signale für zwei 1,2,4-trisubstituierte Aromaten und das Signal der Protonen einer Methoxygruppe. Besonders auffällig waren ein Doppeldublett bei  $\delta$  4.27 ppm (1H, *dd*,  $J = 10.5$  und  $16.0$  Hz), ein Dublett bei  $\delta$  5.51 ppm (1H, *d*,  $J = 6.5$  Hz) und ein Multiplett bei  $\delta$  3.59 ppm (2H, *m*). Zusammen mit den Ergebnissen aus dem H-H-COSY-Spektrum war zu erkennen, dass es sich um ein ABX-System handelte, dem aber noch ein zusätzlicher Kopplungspartner angeschlossen war. Das Proton bei  $\delta$  4.27 ppm wies eine geminale Kopplungskonstante von  $J = 16.0$  Hz und eine Kopplungskonstante von  $J = 10.5$  Hz auf. Dies ist typisch für eine äquatoriale Stellung der Substituenten, wenn sich die koppelnden Protonen in einem Ringsystem befinden. Beide Kopplungspartner konnten in dem Multiplett-Signal wiedergefunden werden. Auch das Dublett bei  $\delta$  5.51 ppm zeigte Korrelationen mit dem Multiplett. Zusammen mit der Molmasse von  $m/z$  270 und der durch HR-MS-Messung bestimmten Summenformel  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$  ließ sich als Struktur ein Pterocarpan formulieren.



**Abbildung 2.13:** Strukturen der aus *Andira inermis* isolierten Pterocarpane **17-19** (relative Konfiguration).

Zusätzlich lagen in dem Molekül je eine Hydroxy- und eine Methoxygruppe vor. Mit Hilfe von <sup>13</sup>C-NMR-Vergleichsdaten (Agrawal und Bansal, 1989) konnte Verbindung **17** als 3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan (Medicarpin, Abb. 2.13) identifiziert werden. Erste Vermutungen von McMurry und Martin (1972), dass dieses Pterocarpanderivat in *A. inermis* vorkommt, konnten somit eindeutig bestätigt werden.

### Strukturaufklärung von Andiol A (18)

Die Verbindung **18** zeigte im EI-Massenspektrum einen Molekülionpeak bei  $m/z$  342. Mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie wurde die Summenformel C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub> ermittelt.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 2.14, Tab. 2.6) wies auf das Vorhandensein einer Methylenedioxygruppe (2H,  $\delta$  6.01 ppm, *s*), eines isolierten aromatischen Protons (1H,  $\delta$  6.81 ppm, *s*) und einer Methoxygruppe (3H,  $\delta$  4.16 ppm, *s*) hin. Desweiteren waren die Protonensignale eines 1,2,4-trisubstituierten aromatischen Ringes und das typische Kopplungsmuster eines ABX-Systems ( $\delta$  4.03 ppm, 1H, *dd*,  $J = 1.9$  und 12.4 Hz,  $\delta$  4.46 ppm, 1H, *dd*,  $J = 3.8$  und 12.4 Hz,  $\delta$  5.18 ppm, 1H, *dd*,  $J = 1.9$  und 3.8 Hz) zu erkennen. Die chemischen Verschiebungen ähnelten den Protonen an C-6 und C-6a von 12a-Hydroxyrotenoiden (Abe et al., 1985). Die üblichen Zählweisen von Rotenoiden und Pterocarpanen sind nicht identisch und daher in Abbildung 2.12 angegeben. Für Verbindung **18** wurde als Zählweise, die der Pterocarpane gewählt. Im HMBC-Spektrum (Abb. 2.16, Tab. 2.6) zeigten die Protonen bei  $\delta$  4.03, 4.46 ppm (CH<sub>2</sub>OH) und 5.18 ppm (H-6) Korrelationen zu einem Kohlenstoffatom bei  $\delta$  117.9 ppm (C-6a), welches einer Doppelbindung zugeordnet werden konnte. H-6 zeigte darüber hinaus eine Korrelation zu einem C-Atom bei  $\delta$  150.2 ppm (C-11a). Die chemische Verschiebung der beiden Kohlenstoffe C-6a ( $\delta$  117.9 ppm) und C-11a ( $\delta$  150.2 ppm) im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (Abb. 2.15, Tab. 2.6) ist charakteristisch für eine Enoletherpartialstruktur. Andererseits mußte die bei Rotenoiden vorhandene Etherbrücke zwischen den Kohlenstoffatomen C-6 und C-4a geöffnet vorliegen, so dass man bei Verbindung **18** von einem umgewandelten Rotenoidgrundgerüst ausgehen konnte und somit ein 6-Hydroxymethylpterocarpan (Abb. 2.13) vorlag.

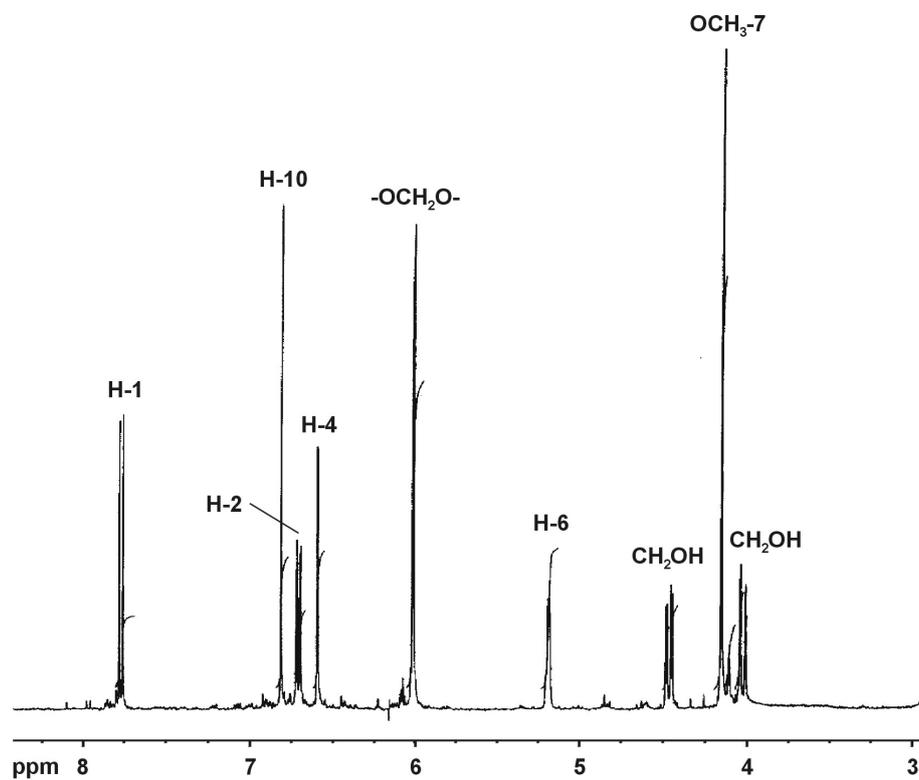


Abbildung 2.14:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Andriol A (**18**, 400 MHz, AcetonD<sub>6</sub>).

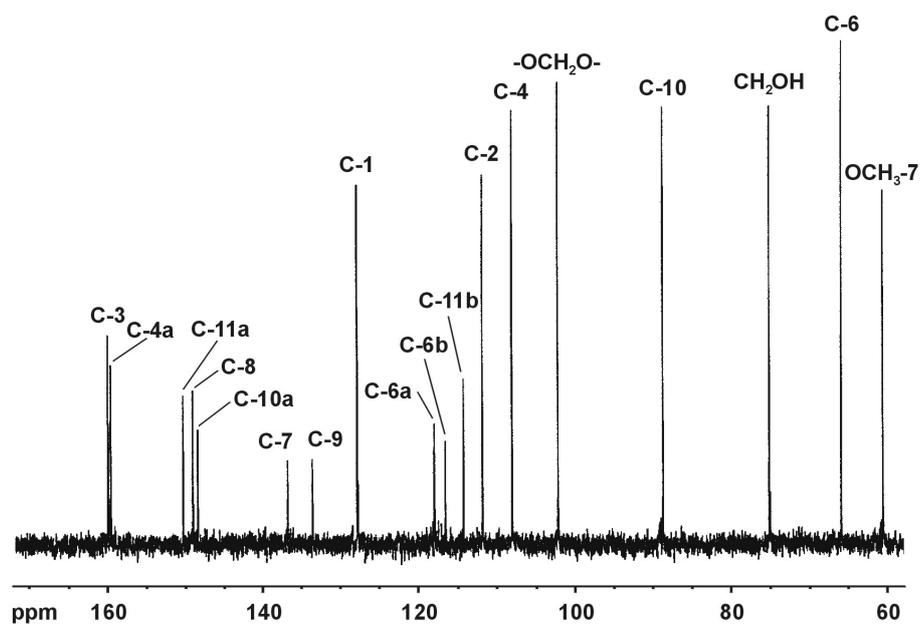


Abbildung 2.15:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Andriol A (**18**, 100.6 MHz, AcetonD<sub>6</sub>).

Die Positionen der Methylendioxygruppe und der Hydroxygruppe ließen sich aus der HMBC-Messung ableiten (Abb. 2.16), während die Stellung der Methoxygruppe an C-7 durch NOE-Experimente geklärt werden konnte. Die Einstrahlung bei  $\delta$  4.16 ppm (3H, s) führte zur Verstärkung des Signals bei  $\delta$  5.18 ppm (1H, *dd*, H-6). Schließlich ergab sich die Struktur von 3-Hydroxy-7-methoxy-8,9-methyldioxy-6-hydroxymethylpterocarpin (Abb. 2.13).

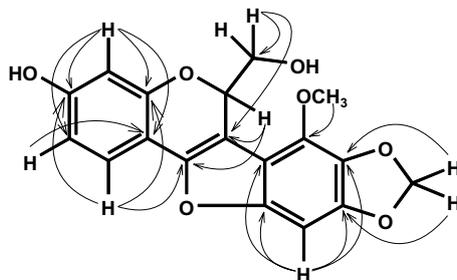


Abbildung 2.16: HMBC-Korrelationen von Andiol A (**18**).

Weder die Verbindung **18** noch das Grundgerüst eines 6-Hydroxymethylpterocarpins sind bisher in der Natur oder als Synthetikum beschrieben worden, so dass für **18** der Name Andiol A vorgeschlagen wurde.

### Strukturaufklärung von Andiol B (**19**)

Die Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.6) von Verbindung **19** ähnelten stark denen von **18**. Die durch HR-Massenspektrometrie ermittelte Summenformel betrug  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$ , **19** besaß somit eine Molekularmasse von  $m/z$  312 (EI-MS). Im Gegensatz zu Andiol A (**18**) konnte kein Signal für eine Methoxygruppe detektiert werden, was sich mit der Molekülmassendifferenz von 30 deckt. Die Singulets bei  $\delta$  7.08 ppm und  $\delta$  7.14 ppm stellten die in *para*-Stellung zueinander stehenden Protonen an C-10 bzw. C-7 dar. Da die chemischen Verschiebungen der restlichen aromatischen Signale und der Methylendioxygruppe nahezu identisch mit denen von **18** waren, wurde bei Verbindung **19** auf das 7-Demethoxyderivat von **18** geschlossen, also auf 3-Hydroxy-8,9-methyldioxy-6-hydroxymethylpterocarpin (Abb. 2.13). Für diesen Naturstoff wurde der Name Andiol B vorgeschlagen.

#### 2.2.1.6 Strukturaufklärung weiterer Substanzen 20-21

Aus dem methanolischen Extrakt der Blattdroge aus Ghana konnte aus Fraktion 3 der  $\text{CHCl}_3$ -Fraktion Verbindung **20** isoliert werden (Kap. 5.5.1.4). Ebenfalls aus dem methanolischen Extrakt der Blätter, diesmal aber aus der Panamadroge, konnte aus Fraktion 2 der  $\text{CHCl}_3$ -Fraktion Verbindung **21** isoliert werden (Kap. 5.5.1.2). Die Strukturen wurden mit Hilfe von EI-MS- und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aufgeklärt.

**Tabelle 2.6:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten [400 MHz, AcetonD<sub>6</sub>,  $\delta$  (ppm)],  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten [100.6 MHz, AcetonD<sub>6</sub>,  $\delta$  (ppm)] und HMBC-Korrelationen von Andiol A (**18**) und  $^1\text{H}$ -NMR-Daten [400 MHz, AcetonD<sub>6</sub>,  $\delta$  (ppm)] von Andiol B (**19**).

Proton <sup>a</sup>	C-Atom <sup>a</sup>	<b>18</b>			<b>19</b>	
		$\delta_{\text{H}}^b$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC Korrelationen <sup>c</sup>	$\delta_{\text{H}}^b$	
H-1	C-1	7.76 (1H, <i>d</i> , 8.6)	127.8	3,4a,11a	7.76 (1H, <i>d</i> , 8.8)	
H-2	C-2	6.71 (1H, <i>dd</i> , 2.3, 8.6)	111.8	11b	6.72 (1H, <i>dd</i> , 2.3, 8.8)	
-	C-3		159.8 <sup>d</sup>			
H-4	C-4	6.60 (1H, <i>d</i> , 2.3)	108.2	2,3,4a,11b	6.60 (1H, <i>d</i> , 2.38)	
-	C-4a		159.5 <sup>d</sup>			
H-6	C-6	5.18 (1H, <i>dd</i> , 1.9, 3.8)	65.9	6a,11a	5.06 (1H, <i>m</i> )	
-	C-6a		117.9 <sup>e</sup>			
-	C-6b		116.5 <sup>e</sup>			
H-7	C-7		136.7		7.14 (1H, <i>s</i> )	
-	C-8		148.9 <sup>f</sup>			
-	C-9		133.5			
H-10	C-10	6.81 (1H, <i>s</i> )	88.8	6b,8,9,10a	7.08 (1H, <i>s</i> )	
-	C-10a		148.4 <sup>f</sup>			
-	C-11a		150.2			
-	C-11b		114.2			
$\underline{\text{CH}}_2\text{OH}$	$\underline{\text{CH}}_2\text{OH}$	4.03 (1H, <i>dd</i> , 1.9, 12.4)	75.1	6a, $\text{CH}_2\text{OH}^g$	4.12 (1H, <i>dd</i> , 2.2, 12.2)	
		4.46 (1H, <i>dd</i> , 3.8, 12.4)			4.41 (1H, <i>dd</i> , 4.4, 12.2)	
$\text{OCH}_3$ -7	$\text{OCH}_3$ -7	4.16 (3H, <i>s</i> )	60.6	7		
$-\text{OCH}_2\text{O}-$	$-\text{OCH}_2\text{O}-$	6.01 (2H, <i>s</i> )	102.2	8,9	6.03 (2H, <i>s</i> )	

<sup>a</sup> Bezifferung der Pterocarpane

<sup>b</sup> Intensitäten, Kopplungsmuster und *J*-Werte (Hz) in Klammern

<sup>c</sup> CD<sub>3</sub>OD als Lösemittel

<sup>d</sup> Werte austauschbar

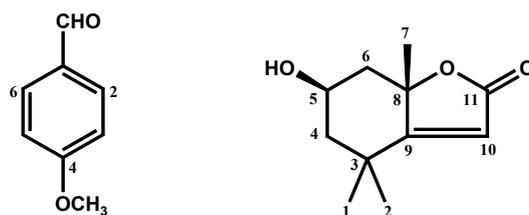
<sup>e</sup> Werte austauschbar

<sup>f</sup> Werte austauschbar

<sup>g</sup> <sup>1</sup>*J*-Korrelation

### Strukturaufklärung von Anisaldehyd (**20**)

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte das Signal einer Methoxygruppe (3H,  $\delta$  3.92 ppm, *s*), einer Aldehydfunktion (1H,  $\delta$  9.84 ppm, *s*), sowie die Signale eines *para*-substituierten Aromaten ( $\delta$  7.00 ppm, 2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-3/5,  $\delta$  7.79 ppm, 2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-2/6). Die Daten deuteten auf eine aromatische Aldehydverbindung hin. Durch den direkten Vergleich der Daten mit Anisaldehyd (Roth) konnte **20** als dieser identifiziert werden (Abb. 2.17).



**Abbildung 2.17:** Strukturen von Anisaldehyd (**20**) und Loliolid (**21**) isoliert aus *Andira inermis* (relative Konfiguration).

### Strukturaufklärung von Loliolid (**21**)

Das Massenspektrum von **21** ergab einen Molpeak bei  $m/z$  196, was einer Summenformel von  $C_{11}H_{16}O_3$  entsprach. Das Fragment bei  $m/z$  178 deutete auf eine Wasserabspaltung hin.

Im  $^1H$ -NMR-Spektrum waren drei Singulets bei  $\delta$  1.27, 1.47 und 1.74 ppm zu erkennen, die drei Methylgruppen zuzuordnen waren. Das Singulett bei  $\delta$  5.68 ppm mit einem Integral für 1 H deutete auf ein isoliertes olefinisches Proton hin. Desweiteren zeigte das Spektrum ein Triplett bei  $\delta$  4.29 ppm mit einer Kopplungskonstante von  $J = 3.0$  Hz, welches zunächst auf zwei Kopplungspartner hindeutete. Anhand der chemischen Verschiebung des Signals konnte auf die direkte Nachbarschaft des Protons mit einer Hydroxygruppe geschlossen werden. Die restlichen vier Signale entsprachen jeweils einem Proton, wobei zwei dieser Signale ( $\delta$  1.54 ppm, 1H,  $J = 3.0$  und 14.0 Hz,  $\delta$  1.72 ppm, 1H,  $J = 3.0$  und 14.0 Hz) ein Doppeldublett mit einer vicinalen und einer geminalen Kopplung ausbildeten. Die anderen beiden Signale ( $\delta$  1.99 ppm, 1H,  $J = 3.0$  und 14.0 Hz,  $\delta$  2.39 ppm, 1H,  $J = 3.0$  und 14.0 Hz) spalteten sich jeweils in ein Dublett eines Triplets auf. Aufgrund des Kopplungsmusters und der Tatsache, dass keine weiteren Protonensignale im Spektrum zu erkennen waren, konnte man auf das Vorhandensein zweier Methylengruppen schließen. Diese lagen nicht benachbart zueinander und die zusätzliche Aufspaltung in ein *dt* bei  $\delta$  1.99 und 2.39 ppm konnte durch das Vorliegen einer W-Kopplung der beiden äquatorialen Protonen der Methylengruppen untereinander erklärt werden. Das Proton bei  $\delta$  4.29 ppm konnte schließlich nur zwischen den beiden Methylengruppen liegen. Die Aufspaltung in ein Quintett, die eigentlich zu erwarten gewesen wäre, blieb aufgrund der identischen Kopplungskonstanten aus. Die Verschiebung des olefinischen Signals und die Tatsache, dass laut Massenspektrum neben der im  $^1H$ -NMR-Spektrum zu erkennenden Hydroxygruppe noch zwei weitere Sauerstoffatome im Molekül vorhanden sein mußten, machten einen  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Laktanring wahrscheinlich. Da sich aus der Summenformel insgesamt vier Doppelbindungsäquivalente ergaben, wovon erst drei durch den ungesättigten Laktanring abgedeckt wurden, mußte noch ein weiterer Ring im Molekül vorhanden sein. Die geminalen Methylgruppen deuteten auf ein Terpenderivat hin. Die Zahl von 11 Kohlenstoffatomen spricht allerdings dagegen, so dass es sich eher um das Abbauprodukt eines größeren Terpenoids handeln könnte.

Durch Vergleich der ermittelten Daten mit Literaturangaben (Tanaka und Matsunaga, 1989) erwies sich Verbindung **21** als Loliolid (Abb. 2.17), einem in der Natur weitverbreiteten Abbauprodukt der Carotinoide.

Tabelle 2.7: Übersicht der isolierten bzw. detektierten Naturstoffe aus den aktiven Fraktionen der untersuchten Drogen von *Andira inermis*.

Naturstoffe	Panama <sup>a</sup>		Ghana <sup>b</sup>	
	Zweige	Blätter	Zweige	Blätter
<i>Isoflavone</i>				
Formononetin (1)	+	+	+	–
Calycosin (2)	+	+	+	–
Genistein (3)	+	–	+	–
Biochanin A (4)	+	–	+	–
Prunetin (5)	+	+	+	–
Pratensein (6)	+	–	+	–
Afrormosin (7)	–	+	–	–
<i>Flavanonolglykoside</i>				
Dihydrokämpferol-3- <i>O</i> -rhamnosid (8)	–	+	–	–
Taxifolin-3- <i>O</i> -rhamnosid (9)	–	+	–	–
3''- <i>O</i> - <i>trans</i> -Cinnamoylastilbin (10)	–	+	–	–
<i>Flavanone</i>				
Naringenin (11)	–	–	+	–
Sakuranetin (12)	–	–	–	+
<i>2-Arylbenzofurane</i>				
Andinermal A (13)	–	+	–	+
Andinermal B (14)	–	+	–	–
Andinermal C (15)	–	+	–	–
Andinermol (16)	–	–	–	+
<i>Pterocarpane</i>				
Medicarpin (17)	+	–	–	–
Andirol A (18)	–	+	–	+
Andirol B (19)	–	–	–	+
<i>weitere Substanzen</i>				
Anisaldehyd (20)	–	–	–	+
Loliolid (21)	–	+	–	–

<sup>a</sup> Ernte März 1997<sup>b</sup> Ernte März 2000

+ : Naturstoff wurde aus aktiven Fraktionen isoliert bzw. detektiert

– : Naturstoff wurde im Rahmen der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung nicht isoliert bzw. detektiert

## 2.2.2 Pharmakologische Untersuchung von *Andira inermis*

### *In-vitro*-Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*

Die antiplasmodialen Aktivitäten der Rohextrakte und isolierten Verbindungen aus *A. inermis* sind in Tabelle 2.8 wiedergegeben.

Während die methanolischen und wässrigen Extrakte keine Aktivität aufwiesen ( $IC_{50}$ -Werte  $> 100 \mu\text{g/ml}$ ), zeigten die lipophilen Extrakte, insbesondere der Blattextrakt, eine moderate Aktivität gegen *P. falciparum*. Betrachtet man die isolierten Naturstoffe, so fällt auf, dass die aktivsten Verbindungen Calycosin (**2**) und Genistein (**3**) aus der Gruppe der Isoflavone, 3''-*O*-*trans*-Cinnamoylastilbin (**10**) aus der Gruppe der Flavanonolglykoside und die 2-Arylbenzofurane waren. Im Folgenden wird auf die einzelnen Substanzklassen eingegangen.

Innerhalb der Isoflavone ließ sich keine Abhängigkeit der Wirkung vom Substitutionsmuster feststellen. Wie schon erwähnt zeigten Genistein (**3**) und Calycosin (**2**) die höchsten Aktivitäten mit  $IC_{50}$ -Werten von 2.0 / 4.2  $\mu\text{g/ml}$  (PoW) und 4.1 / 9.8  $\mu\text{g/ml}$  (Dd2). Die restlichen Isoflavone waren moderat bis gar nicht wirksam.

Die Flavanonolglykoside **8** und **9** wiesen keine antiplasmodiale Wirkung auf, während sich für 3''-*O*-*trans*-Cinnamoylastilbin (**10**) 50%-ige Hemmkonzentrationen von 9.1  $\mu\text{g/ml}$  (PoW) und 3.9  $\mu\text{g/ml}$  (Dd2) ergaben. Offensichtlich erhöht der *trans*-Cinnamoyl-Anteil die antiplasmodiale Aktivität des unsubstituierten Rhamnosids **9**. Das Aglykon Taxifolin, welches laut Lock de Ugaz et al. (1991) ebenfalls in *A. inermis* enthalten ist, wurde zu Vergleichszwecken getestet und war mit  $IC_{50}$ -Werten von 15.8  $\mu\text{g/ml}$  (PoW) und 38.4  $\mu\text{g/ml}$  (Dd2) deutlich schwächer wirksam als **10**.

Das Flavanon Naringenin (**11**) zeigte gegenüber dem Dd2-Stamm eine schwache Aktivität ( $IC_{50}$ -Wert: 15.9  $\mu\text{g/ml}$ ) und erwies sich gegenüber PoW als unwirksam. Ein Vergleich zum Methylderivat Sakuranetin (**12**) war aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich.

Die 2-Arylbenzofurane zeigten, abgesehen von Andinermal B (**14**), das in zu geringer Menge vorlag, alle eine gute bis moderate Aktivität. Andinermal A (**13**) war am aktivsten mit  $IC_{50}$ -Werten von 2.1  $\mu\text{g/ml}$  (PoW) und 3.9  $\mu\text{g/ml}$  (Dd2), Andinermal C (**15**) geringfügig schwächer ( $IC_{50}$ -Werte: 5.8  $\mu\text{g/ml}$  [PoW], 6.0  $\mu\text{g/ml}$  [Dd2]) und Andinermol (**16**) wies die geringste Hemmwirkung auf ( $IC_{50}$ -Werte: 8.6  $\mu\text{g/ml}$  [PoW], 13.7  $\mu\text{g/ml}$  [Dd2]). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Aktivität ist die Lipophilie der einzelnen Verbindungen. Andinermal C (**15**) besitzt eine Methoxygruppe weniger als **13** und ist im Vergleich schwächer wirksam. Die Hydromethylgruppe in Position 3 von Andinermol (**16**) scheint in diesem Fall für die Abnahme der Aktivität verantwortlich zu sein.

In der Gruppe der Pterocarpane konnten keine bemerkenswerten Aktivitäten festgestellt werden. Zwar zeigten sich Medicarpin (**17**) und Andiol A (**18**) gegenüber PoW und Dd2 unterschiedlich aktiv, doch lagen die  $IC_{50}$ -Werte deutlich über der festgesetzten Grenze von 20  $\mu\text{M}$  (Kap. 2). Andiol B (**19**) wurde nicht getestet. Das Carotinoidabbauprodukt Loliolid (**21**) besitzt keine Aktivität und der Aldehyd **20** wurde nicht getestet.

**Tabelle 2.8:** *In-vitro*-Aktivität von Extrakten und isolierten Naturstoffen aus *Andira inermis* gegen *Plasmodium falciparum*.

Extrakt/isolierter Naturstoff	IC <sub>50</sub> -Werte <sup>a</sup>			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
<i>Extrakte</i> <sup>b</sup>				
Lipophiler Blattextrakt	56.0	-	58.6	-
Hydrophiler Blattextrakt	> 100	-	> 100	-
Wässriger Blattextrakt	> 100	-	> 100	-
Lipophiler Zweigextrakt	82.0	-	108.7	-
Hydrophiler Zweigextrakt	> 100	-	> 100	-
Wässriger Zweigextrakt	> 100	-	> 100	-
<i>Isoflavone</i>				
Formononetin (1)	> 50	> 186	> 50	> 186
Calycosin (2)	<b>4.2</b>	<b>14.8</b>	<b>9.8</b>	<b>34.5</b>
Genistein (3)	<b>2.0</b>	<b>7.4</b>	<b>4.1</b>	<b>15.2</b>
Biochanin A (4)	46.8	165.0	> 50	> 176
Prunetin (5)	27.8	97.8	> 50	> 176
Pratensein (6)	45.0	150.0	> 50	> 167
Afromosin (7)	39.6	133.0	42.5	142.0
<i>Flavanonolglykoside</i>				
Dihydrokämpferol-3- <i>O</i> -rhamnosid (8)	> 50	> 115	> 50	> 115
Taxifolin-3- <i>O</i> -rhamnosid (9)	> 50	> 111	> 50	> 111
3 <sup>o</sup> - <i>O</i> - <i>trans</i> -Cinnamoylastilbin (10)	<b>9.1</b>	<b>15.7</b>	<b>3.9</b>	<b>6.7</b>
<i>Flavanone</i>				
Naringenin (11)	43.8	161.0	15.9	58.5
<i>2-Arylbenzofurane</i>				
Andinermal A (13)	<b>2.1</b>	<b>6.1</b>	<b>3.9</b>	<b>11.3</b>
Andinermal C (15)	<b>5.8</b>	<b>17.6</b>	<b>6.0</b>	<b>18.2</b>
Andinermol (16)	<b>8.6</b>	<b>23.8</b>	<b>13.7</b>	<b>38.1</b>
<i>Pterocarpane</i>				
Medicarpin (17)	15.0	55.5	28.2	104.4
Andirol A (18)	15.0	43.9	42.5	124.3
<i>weitere Substanzen</i>				
Loliolid (21)	> 50	> 255	> 50	> 255
<i>Kontrolle</i>				
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.008	0.015	0.073	0.14
Taxifolin	15.8	52.0	38.4	126.0

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten<sup>b</sup> Drogenmaterial aus Panama

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass obwohl die lipophilen Rohextrakte von *A. inermis* nur moderat aktiv waren, sich die phytochemische Untersuchung als lohnenswert erwiesen hat. So konnten sowohl in der Gruppe der Isoflavone als auch in der der 2-Arylbenzofurane Vertreter mit antiplasmodialen Eigenschaften nachgewiesen werden. Da diese Pflanzenart aber auch viele andere unwirksame Sekundärstoffe produziert und die wirksamen Verbindungen teilweise nur in geringen Mengen vorliegen, könnte dies eine mögliche Erklärung für die geringe Aktivität der Rohextrakte sein.

### ***In-vitro*-Aktivität gegen ECV-304-Zellen**

Bezüglich der Zytotoxizität wurde nur die Aktivität von Andinermal A (**13**) bestimmt. Es wies gegenüber den humanen ECV-304-Zellen einen  $IC_{50}$ -Wert von  $18.0 \mu\text{g/ml}$  ( $52.3 \mu\text{M}$ ) auf. Der Selektivitätsindex (Kap. 5.4.5) betrug somit 4.62 bezogen auf Dd2.

### **2.2.3 Untersuchung des Milchextraktes aus den Zweigen von *Andira inermis***

Aufgrund der Tatsache, dass der methanolische Extrakt keine Aktivität im *in-vitro*-Test zeigte, sollte festgestellt werden, ob antiplasmodiale Substanzen aus einem Milchextrakt aus der Zweigdroge nachweisbar waren. Laut Morton (1981) wird in einigen Regionen die Rinde in kochender Milch zubereitet. Eine mögliche Erklärung wäre zum einen die Überdeckung des bitteren Geschmacks oder der Fettanteil der Milch beeinflusst, als lipophile Komponente, positiv das Extraktionsverfahren.

Die Herstellung und Aufarbeitung ist in Kapitel 5.5.2 beschrieben. Nachdem der Fettanteil weitestgehend entfernt worden war, konnten mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrometrie in einer Fraktion die charakteristischen Signale (z. B. das Singulett von H-2 bei  $\delta$  8.0 - 8.2 ppm) eines bzw. mehrere Isoflavone, die sich aber nur in sehr geringen Anteilen in der Fraktion befanden, nachgewiesen werden. Eine Isolierung der Verbindungen war aufgrund der offensichtlich kleinen Mengen nicht möglich. Zudem war der Anteil weiterer Substanzen, insbesondere solche aus der Milch (Zucker u.s.w.), verhältnismäßig groß, was sich negativ auf die herkömmlichen Isolierungsmethoden auswirkte. Inwieweit extrahierte Naturstoffe im Fettanteil der Milch vorlagen, wurde nicht untersucht.

Wenngleich in geringer Menge, so waren doch Isoflavone in diesem Milchextrakt nachweisbar. Der geringe prozentuale Anteil der in der Milch gelösten Naturstoffe ist somit eine mögliche Erklärung für die schlechte *in-vitro*-Aktivität ( $IC_{50}$ -Werte  $> 100 \mu\text{g/ml}$ ) des Gesamtextraktes.

### 2.2.4 *In-vitro*-Aktivität einiger synthetischer Isoflavone

Nachdem eine antiplasmodiale Aktivität bei den Isoflavonen Calycosin (**2**) und Genistein (**3**) nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, inwieweit Partialsynthetika eine Wirkung auf *P. falciparum* ausüben. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Werner Löwe, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin, werden Isoflavonderivate als Zwischenstufen in der Synthese potentiell antiestrogen wirksamer Substanzen gewonnen (Loewe et al., 2001). Einige dieser Derivate (**I1-I6**, Abb. 2.18) wurden für den *in-vitro*-Test zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Amino- oder Nitro-Verbindungen, die sich formal mit dem Substitutionsmuster im Ring A von Formononetin (**1**) und Genistein (**3**) decken. In Tabelle 2.9 sind die Ergebnisse dargestellt.

**Tabelle 2.9:** *In-vitro*-Aktivität einiger synthetischer Isoflavone (**I1-I6**) sowie **1** und **3** gegen *Plasmodium falciparum*.

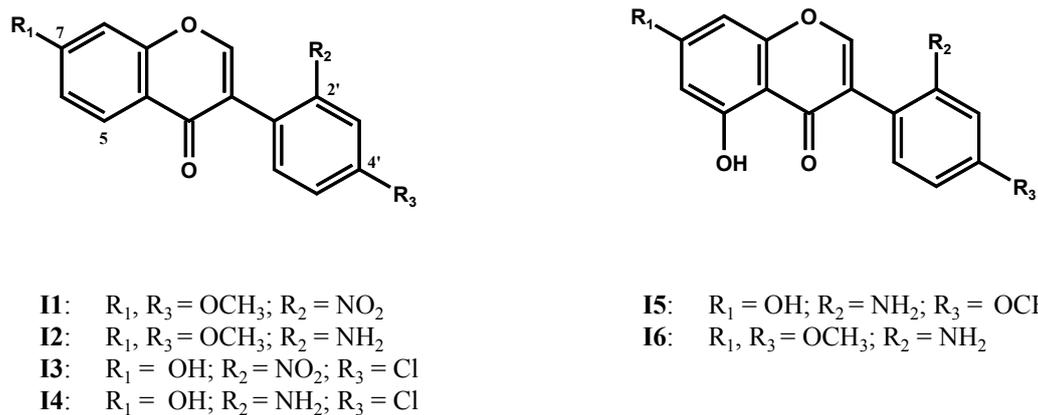
Isoflavon	IC <sub>50</sub> -Werte <sup>a</sup>			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
<i>Synthetische Isoflavone</i> <sup>b</sup>				
4',7-Dimethoxy-2'-nitroisoflavon ( <b>I1</b> )	36.2	110.7	26.0	79.5
2'-Amino-4',7-dimethoxyisoflavon ( <b>I2</b> )	12.5	42.1	15.0	50.5
4'-Chlor-7-hydroxy-2'-nitroisoflavon ( <b>I3</b> )	17.4	54.9	13.9	48.4
2'-Amino-4'-chlor-7-hydroxyisoflavon ( <b>I4</b> )	47.3	164.8	> 50	> 174
2'-Amino-5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon ( <b>I5</b> )	> 50	> 167	> 50	> 167
2'-Amino-4',7-dimethoxy-5-hydroxyisoflavon ( <b>I6</b> )	> 50	> 160	28.6	91.6
<i>Isoflavone</i> <sup>c</sup>				
Formononetin ( <b>1</b> )	> 50	> 186	> 50	> 186
Genistein ( <b>3</b> )	2.0	7.4	4.1	15.2
<i>Kontrolle</i>				
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.008	0.015	0.073	0.14

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten

<sup>b</sup> hergestellt im Arbeitskreis Prof. W. Löwe, Freie Universität Berlin

<sup>c</sup> isoliert aus *A. inermis*

Es konnte bei keinem der getesteten Derivate eine Aktivität < 20 µM nachgewiesen werden. Diese für Naturstoffe geltende Grenze ist für partialsynthetische bzw. vollsynthetische Substanzen sicherlich ebenfalls anzusetzen, so dass man alle getesteten Isoflavonderivate als inaktiv bezeichnen kann.



**Abbildung 2.18:** Strukturen verschiedener, gegen *Plasmodium falciparum* getesteter, synthetischer Isoflavone.

Von den vom Formononetin (**1**,  $\text{IC}_{50}$ -Wert  $> 50 \mu\text{g/ml}$  /  $> 186 \mu\text{M}$ ) abgeleiteten Isoflavonen (**I1-I4**) zeigten **I2** und **I3** die höchsten Aktivitäten ( $\text{IC}_{50}$ -Werte etwa  $50 \mu\text{M}$ ) und waren somit aktiver als der Naturstoff. Die Derivate (**I5-I6**), die mit Genistein (**3**,  $\text{IC}_{50}$ -Wert  $2.0 \mu\text{g/ml}$  /  $7.4 \mu\text{M}$  [PoW]) strukturell verwandt sind, lagen außerhalb unseres Messbereiches von  $50 \mu\text{g/ml}$ .

### 2.2.5 Phytochemische Untersuchung von *Artemisia afra*

*Artemisia afra* JACQ. (Abb. 2.19), Asteraceae, im Volksmund auch 'Lanyana' oder 'African Wormwood' (<engl.> afrikanischer Beifuß) genannt, findet man als einzige der ca. 400 Arten der Gattung *Artemisia* in den Bergregionen von Kenia, Tansania und im südlichen Afrika. Der bis zu einem Meter hohe, aufrechte Strauch hat grau-grüne, fiederschnittige und an der Unterseite filzig-behaarte Blätter, die beim Zerreiben aromatisch riechen. Die Rinde ist dünn und braun gefärbt. Die gelblichen Blütenköpfe stehen in einer Rispe, die Einzelblüten sind unscheinbar (Prodomus, Flora Südwestafrika, 1967-69, Vol. 100-140).

Das auffällige blau-grüne ätherische Öl gleicht hinsichtlich der Zusammensetzung dem in Europa bekannten Wermutöl (*Artemisia absinthium* L.). Der Geruch von Campher und 1,8-Cineol, welche die Hauptkomponenten darstellen, ist deutlich wahrzunehmen, der Geschmack ist bitter (Buchbauer und Silbernagel, 1989).

*A. afra* gehört zu den bekanntesten Heilpflanzen im Süden Afrikas. Die Anwendung erfolgt für gewöhnlich in Form von Tees (Infusion oder Dekokt), aber auch durch Inhalation. Die Anwendungsgebiete sind vor allem Erkältungserscheinungen wie Husten, Dyspepsien und Appetitlosigkeit, Magenschmerzen und andere gastrointestinale Beschwerden. Ebenso wird sie bei Fieberanfällen, Wurmbefall und 'Blutvergiftungen' eingesetzt. Jeder Volksstamm nutzt die Pflanze gegen die unterschiedlichsten Krankheiten und auch die in Afrika ansässigen Europäer setzen sie, z. B. bei Masern oder im Besonderen gegen durch Malaria ausgelöste Fieberanfälle ein. Sogar im *Barosma betulina*, einem südafrikanischen Kräuterwein, findet man *A. afra* wieder (Watt und Breyer-Brandwijk, 1962; Buchbauer und Silbernagel, 1989).

In der Literatur liegen neben Arbeiten über die phytochemische Zusammensetzung des ätherischen Öls (Buchbauer und Silbernagel, 1989) Untersuchungen von Bohlmann und Mitarbeitern vor, die sich eingehend mit *A. afra* beschäftigten, um deren Inhaltsstoffe mit denen der europäischen *Artemisia*-Arten zu vergleichen. In den Wurzeln lagen neben einigen Cumarinen hauptsächlich Acetylene vor (Bohlmann und Zdero, 1972). Die Arbeit von Jakupovic et al. (1988) ist sicherlich die ausführlichste. Hier wurden aus den oberirdischen Pflanzenteilen mehrere Sesquiterpenlaktone vom Glaukolid- und Guaianolid-Typ isoliert. In den Exsudaten der Blätter konnten sechs Flavonoide, die meist in Position 6 methoxyliert vorlagen, detektiert werden (Wollenweber und Mann, 1989). Es liegt zudem eine Arbeit zur antiplasmodialen Aktivität dieser Pflanzenart vor, die aber keine Angaben zu den IC<sub>50</sub>-Werten der isolierten Naturstoffe macht (Nkunya et al., 1992).

Im Rahmen der Untersuchungen von neun Heilpflanzen aus Zimbabwe, die traditionell zur Therapie der Malaria eingesetzt werden, zeigte der Extrakt aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *A. afra* eine gute *in-vitro*-Aktivität (IC<sub>50</sub>-Werte: 8.9 µg/ml [PoW], 15.3 µg/ml [Dd2], Kap. 2.1). Durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung des Extraktes konnten verschiedene Sesquiterpenlaktone und Flavonoide aus den aktiven Fraktionen (Angabe der IC<sub>50</sub>-Werte s. Kap. 5.6.1) isoliert werden. Im folgenden Abschnitt soll zunächst auf die Strukturaufklärung der Naturstoffe aus *A. afra* eingegangen werden, bevor die biologischen Aktivitäten der einzelnen Verbindungen behandelt werden.



**Abbildung 2.19:** Oben: *Artemisia afra* JACQ., Asteraceae. Mitte: Blütenköpfchen von *A. afra*. Unten links: Traditionelle Zubereitung. Unten rechts: Krautdroge.

### 2.2.5.1 Strukturaufklärung der Sesquiterpenlaktone 22-29

Aus den Fraktionen 11 und 12 des lipophilen Extraktes von *A. afra* ließen sich Sesquiterpenlaktone, davon sieben vom Guaianolid- und eines vom Eudesman-Typ, isolieren. Die Fraktionierungsschemata sind im Kapitel 5.6.1 angegeben. Die Strukturaufklärung erfolgte unter Zuhilfenahme von EI-MS-,  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sowie anhand von H-H-COSY- und C-H-COSY-Messungen. Da die isolierten Naturstoffe bereits aus dieser Pflanze bekannt waren und diese anhand der vorliegenden Literaturdaten gut vergleichbar waren, wurde die Konfiguration der jeweiligen Substanzen aus den Originalarbeiten übernommen.

#### Strukturaufklärung von $1\alpha,4\alpha$ -Dihydroxybishopsoliceolid (22)

Das EI-Massenspektrum von Verbindung **22** zeigte einen Molekilionpeak bei  $m/z$  320. Die Fragmente bei  $m/z$  305 und 260 deuteten auf den Verlust einer Methylgruppe bzw. einer Acetateinheit hin.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum wies neben einem Acetyl- ( $\delta$  2.15 ppm, 3H, *s*) und einem Methylsingulett ( $\delta$  1.35 ppm, 3H, *s*) vier Signale bei  $\delta$  4.89, 5.13, 5.87 und 6.34 ppm auf, die jeweils einem Proton entsprachen. Zwei dieser Signale ( $\delta$  5.87 und 6.34 ppm) bildeten ein Dublett mit einer kleinen Kopplungskonstante von  $J = 3.0$  Hz aus, die anderen beiden Protonensignale zeigten sich als breites Singulett. Die Lage im Spektrum sowie die kleinen Kopplungskonstanten ließen die Vermutung zu, dass es sich um zwei Exomethylengruppen handeln könnte. Da aus *A. afra* schon in früheren Untersuchungen (Jakupovic et al., 1988) Sesquiterpenlaktone (Glaukolide und Guaianolide) isoliert wurden, konnte zusammen mit den bisherigen Informationen die Struktur eines Guaianolids formuliert werden und die restlichen Protonensignale dieser Grundstruktur zugeordnet werden.

Die beiden Dubletts bei  $\delta$  5.62 und 6.01 ppm (je 1H, *d*,  $J = 5.7$  Hz) konnten aufgrund ihrer Kopplungskonstante und der chemischen Verschiebung ins Tieffeld einer *cis*-Doppelbindung zugeordnet werden, die ohne weitere Kopplungspartner im Molekül vorhanden sein mußte. Die Lage der beiden Signale bei  $\delta$  4.16 (1H, *dd*,  $J = 8.6$  und 11.3 Hz) und 4.90 ppm (1H, *dt*,  $J = 6.0$  und 12.0 Hz) deutete auf die direkte Nachbarschaft mit einem Sauerstoffatom hin, wobei das tiefere Signal bei  $\delta$  4.90 ppm benachbart zur Acetylgruppe stehen mußte. Dieses Proton bildete ein Dublett eines Triplettts aus, so dass von drei Kopplungspartnern ausgegangen werden konnte. Anhand der Kopplungskonstanten ( $J = 6.0$  und 12.0 Hz) ließen sich zu den beiden Signalen bei  $\delta$  2.75 ppm (1H, *dd*,  $J = 6.0$  und 12.0 Hz) und 2.89 ppm (1H, *t*,  $J = 12.0$  Hz), die neben der vicinalen Kopplung eine geminale Kopplung zueinander zeigten, das Dublett eines Triplettts bei  $\delta$  4.90 ppm als Nachbar zuordnen. Anhand der Konstante ( $J = 12.0$  Hz) fand sich der dritte Kopplungspartner im *dddd*-Signal bei  $\delta$  3.65 ppm (1H,  $J = 3.0, 8.6$  und 12.0 Hz). Die Kopplungskonstante von  $J = 3.0$  Hz zeigte an, dass eine Kopplung zwischen diesem Proton und einer der Exomethylengruppen möglich war. Davon ausgehend wurden die Signale bei  $\delta$  5.87 und 6.34 ppm den Protonen an C-13 des Laktonringes und das Signal bei  $\delta$  3.65 ppm H-7 zugeordnet. Die Acetylgruppe befand sich folglich an Position 8 des Guaianolids in Nachbarschaft zur Methylengruppe des C-9 ( $\delta$  2.75 [H-9b] und 2.89 ppm [H-9a]). Da kein weiterer Kopplungspartner vorhanden war, mußte die Methylgruppe (C-14), die sich normalerweise bei einem Guaianolid am C-10 befindet, als Exomethylengruppe formuliert werden. Im Cyclopentanring des Moleküls konnte die Doppelbindung nur zwischen C-2

und C-3 stehen und da keine weiteren Protonen benachbart waren, mußte sich sowohl an C-1 als auch an C-4 je eine Hydroxygruppe befinden. Das Dublett bei  $\delta$  2.46 (1H,  $J = 11.3$  Hz) konnte schließlich H-5 zugeordnet werden. Die Struktur stimmte mit der ermittelten Masse von  $m/z$  320 überein.

In der Literatur ist dieses Guaianolid als  $1\alpha,4\alpha$ -Dihydroxybishopsolicepolid bekannt. Es wurde zum ersten Mal aus den oberirdischen Teilen von *Bishopanthus soliceps* H. ROBINSON, Asteraceae, isoliert. Veröffentlichte Literaturdaten (Singh et al., 1985) stimmten mit denen von **22** (Abb. 2.20) überein. Zudem fand sich dieser Naturstoff auch in der Arbeit über *A. afra* von Jakupovic et al. (1988) wieder.

### Strukturaufklärung von $1\alpha,4\alpha,8\alpha$ -Trihydroxyguaia-2,9,11(13)-trien-12,6 $\alpha$ -olid-8-*O*-acetat (**23**)

Das EI-Massenspektrum von Verbindung **23** zeigte wie **22** erneut einen Molekülionpeak bei  $m/z$  320. Das Fragment bei 260 deutete auch hier den Verlust einer Acetateinheit an, während das Fragment bei  $m/z$  302 auf eine Wasserabspaltung hinwies.

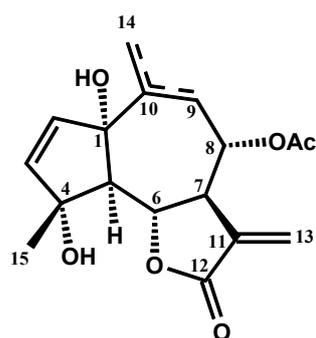
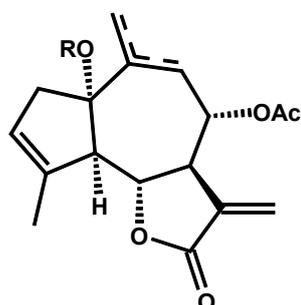
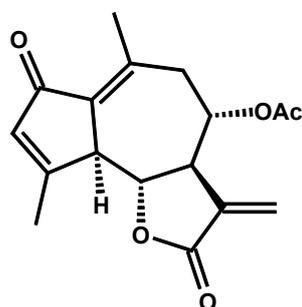
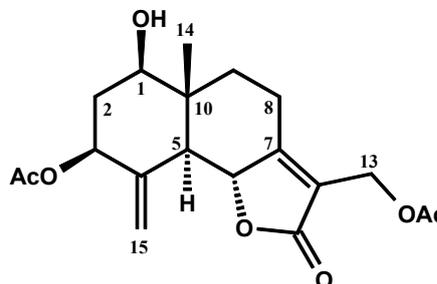
Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ähnelte dem von **22** mit einigen Unterschieden. So trat neben der Methylgruppe bei  $\delta$  1.25 ppm (H-15) eine weitere Methylgruppe auf, deren Signal tieffeldverschoben war ( $\delta$  1.79 ppm, 3H, *s*). Die Signale für die Exomethylengruppe an C-10 sowie für die Methylengruppe des C-9 fehlten. Aufgrund des Dubletts bei  $\delta$  5.71 ppm (olefinisches Proton) mit einer Kopplungskonstante von  $J = 7.0$  Hz, das offensichtlich mit dem Signal von H-8 ( $\delta$  5.26 ppm, 1H, *dt*,  $J = 7.0$  und  $9.0$  Hz) koppelte, konnte auf eine Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 geschlossen werden. Dies erklärte auch die Verschiebung des Signals für die Methylgruppe (H-14) ins Tieffeld. Zur Kontrolle wurde ein H-H-COSY-Spektrum aufgenommen, das die im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum beobachteten Kopplungen der Protonen untereinander bestätigte. Das Signal für H-8 war im Vergleich zu **22** ebenfalls ins Tieffeld verschoben ( $\delta$  5.26 ppm, 1H, *dt*,  $J = 7.0$  und  $9.0$  Hz).

Die restlichen Signale konnten den Protonen des Guaianolidgrundgerüsts zugeordnet werden, so dass sich für Verbindung **23** (Abb. 2.20) die Struktur des  $\Delta^9$ -Epimers von  $1\alpha,4\alpha$ -Dihydroxybishopsolicepolid (**22**) formulieren ließ. Durch den Vergleich mit Literaturdaten (Jakupovic et al., 1991) wurde **23** eindeutig als  $1\alpha,4\alpha,8\alpha$ -Trihydroxyguaia-2,9,11(13)-trien-12,6 $\alpha$ -olid-8-*O*-acetat identifiziert. Diese Verbindung wurde erstmals aus den oberirdischen Teilen von *Artemisia ludoviciana* NUTT. isoliert und bereits für *A. afra* beschrieben (Jakupovic et al., 1988)

### Strukturaufklärung von 1-Desoxy-1 $\alpha$ -peroxy-rupicolin A-8-*O*-acetat (**24**)

Diese Verbindung zeigte im EI-Massenspektrum einen sehr schwachen Molekülionpeak bei  $m/z$  320. Zwei Fragmente lieferten die Information, dass das Molekül eine Peroxid- sowie eine Acetatgruppe ( $m/z$  287  $[\text{M} - \text{OOH}]^+$ , 227  $[\text{287-HOAc}]^+$ ) besitzen mußte.

Tatsächlich konnten beide Partialstrukturen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wiedergefunden werden ( $\delta$  2.17 ppm, 3H, *s*,  $\text{COCH}_3$  und  $\delta$  8.18 ppm, 1H, *brs*,  $-\text{OOH}$ ). Weiterhin waren die Signale für eine ins Tieffeld verschobene Methylgruppe ( $\delta$  1.93 ppm, 3H, *s*), zwei Exomethylengruppen ( $\delta$  5.25 ppm, 1H, *brs*, H-14a,  $\delta$  5.33 ppm, 1H, *brs*, H-14b,  $\delta$  5.72 ppm, 1H, *d*,  $J = 3.0$  Hz, H-13a,  $\delta$  6.31 ppm, 1H, *d*,  $J = 3.0$  Hz, H-13b) und ein zusätzliches olefinisches Proton ( $\delta$  5.53 ppm, 1H, *brs*) zu erkennen. Die Exomethylenprotonen wurden

1  $\alpha$ ,4  $\alpha$ ,-Dihydroxybishopsolicepolid (**22**,  $\Delta$  10)1  $\alpha$ ,4  $\alpha$ ,8  $\alpha$ ,-Trihydroxyguaia-2,9,11(13)-trien-12,6  $\alpha$  -olid-8-*O*-acetat (**23**,  $\Delta$ 9)1-Desoxy-1a-peroxy-rupicolin A-8-*O*-acetat (**24**): R = OH ( $\Delta$  10)1-Desoxy-1a-peroxy-rupicolin B-8-*O*-acetat (**25**): R = OH ( $\Delta$  9)Rupicolin A-8-*O*-acetat (**26**): R = H ( $\Delta$  10)Rupicolin B-8-*O*-acetat (**27**): R = H ( $\Delta$  9)11,13-Dehydromatricarin (**28**)Eudesmafraglaucolid (**29**)

**Abbildung 2.20:** Strukturen der aus *Artemisia afra* isolierten Sesquiterpenlaktone **22-29** (relative Konfiguration).

analog zu Verbindung **22** C-13 und C-14 zugeordnet. Die Protonen des Cycloheptanringes des Guaianolids ließen sich durch den Vergleich der chemischen Verschiebungen mit denen von **22** zuordnen ( $\delta$  2.60 ppm, 2H, *brd*,  $J = 10.0$  Hz, H-9a, H-9b,  $\delta$  3.30 ppm, 1H, *m*, H-7,  $\delta$  3.99 ppm, 1H, *dd*,  $J = 9.0$  und 10.6 Hz, H-6,  $\delta$  4.89 ppm, 1H, *ddd*,  $J = 6.0$ , 8.0 und 10.0 Hz, H-8). Die Signale der Methylengruppe an C-9 fielen zu einem breiten Dublett zusammen. Eine Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 war nicht im Molekül vorhanden, stattdessen wurde aufgrund des tieffeldverschobenen Signals für die Methylgruppe eine Doppelbindung in Position 3,4 postuliert. Das Signal bei  $\delta$  5.53 ppm konnte folglich H-3

zugeordnet werden. Für die restlichen zwei Signale, von denen das breite Singulett bei  $\delta$  2.78 ppm von zwei Protonen gebildet wurde, verblieben noch die Protonen an C-2 und C-5 ( $\delta$  2.78 ppm, 2H, *brs*, H-2a/2b,  $\delta$  2.89 ppm, 1H, *brd*,  $J = 10.5$  Hz, H-5). Die so gefundene Struktur stimmte mit der ermittelten Masse von  $m/z$  336 überein.

Dieses Guaianolid ist als 1-Desoxy-1 $\alpha$ -peroxy-rupicolin A-8-*O*-acetat bekannt und wurde aus den Asteraceen *Cacosmia rugosa* H.B.K. (Wurzeln) und *Artemisia gmelinii* WEB. EX STECHM. (Kraut) isoliert (Bohlmann et al., 1980; Greger et al., 1986). Die Strukturklärung ist in der Arbeit von Greger et al. (1986) beschrieben, dessen Daten sich mit denen von **24** (Abb. 2.20) deckten. Dieser Naturstoff war bereits von Jakupovic et al. (1988) aus dem Kraut von *A. afra* isoliert worden.

### Strukturaufklärung von 1-Desoxy-1 $\alpha$ -peroxy-rupicolin B-8-*O*-acetat (**25**)

Beim Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **24** und **25** fiel auf, dass sich beide Moleküle, wie schon bei den Verbindungen **22** und **23**, nur in der Stellung der Doppelbindung an C-10 bzw. C-9 unterschieden. So waren zwei Methylgruppen im Spektrum zu erkennen, die aufgrund ihrer direkten Nachbarschaft mit einer Doppelbindung ins tiefere Feld verschoben waren ( $\delta$  1.91 ppm, 3H, *s*, H-15,  $\delta$  1.86 ppm, 3H, *brs*, H-14). Die beiden olefinischen Protonen lagen bei  $\delta$  5.45 (1H, *brs*, H-3) und 5.65 ppm (1H, *brs*, H-9). Das H-8 war ebenfalls im Vergleich zu **24**, wie erwartet, tieffeldverschoben ( $\delta$  5.36 ppm, 1H, *brd*,  $J = 10.5$  Hz).

Zusammen mit der Masse von  $m/z$  336 und dem Vergleich mit Literaturdaten (Greger et al., 1986) wurde bestätigt, dass es sich bei **25** um das  $\Delta^9$ -Epimer (1-Desoxy-1 $\alpha$ -peroxy-rupicolin B-8-*O*-acetat, Abb. 2.20) von **24** handelte. Auch dieser Naturstoff wurde in der Arbeit von Jakupovic et al. (1988) bereits erwähnt.

### Strukturaufklärung von Rupicolin A-8-*O*-acetat (**26**)

Die Verbindung **26** zeigte im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum die schon bei **22** beobachteten Signale: eine Methylgruppe, eine Acetylgruppe, zwei Exomethylengruppen sowie das Signal für das Proton an C-8 mit der Estergruppe in Nachbarschaft ( $\delta$  1.93 ppm, 3H, *brs*, H-15,  $\delta$  2.15 ppm, 3H, *s*,  $\text{COCH}_3$ ,  $\delta$  2.56 ppm, 1H, *dd*,  $J = 4.9$ , und 14.0 Hz, H-9b,  $\delta$  2.68 ppm, 1H, *dd*,  $J = 6.5$ , und 14.0 Hz, H-9a,  $\delta$  5.14 ppm, 1H, *brs*, H-14a,  $\delta$  5.39 ppm, 1H, *brs*, H-14b,  $\delta$  5.55 ppm, 1H, *brs*, H-3,  $\delta$  5.64 ppm, 1H, *d*,  $J = 3.0$  Hz, H-13a,  $\delta$  6.23 ppm, 1H, *d*,  $J = 3.0$  Hz, H-13b,  $\delta$  4.92 ppm, 1H, *ddd*,  $J = 4.9$ , 6.4 und 11.0 Hz, H-8). Für den Cyclopentanring ergab sich die gleiche Partialstruktur wie bei **24** und **25** mit einer Doppelbindung zwischen C-3 und C-4 ( $\delta$  5.55 ppm, 1H, *brs*, H-3). Da sich für **26** im Gegensatz zu **22** eine Massendifferenz von 16 ergab ( $m/z$  304  $[\text{M}]^+$ ), mußte anstelle der Peroxidgruppe eine Hydroxygruppe an C-1 stehen.

Somit ergab sich für Verbindung **26** die Struktur von Rupicolin A-8-*O*-acetat (Abb. 2.20), die mit Hilfe von veröffentlichten Daten (Greger et al., 1986) bestätigt wurde. Wie schon das strukturverwandte Peroxid (**24**) wurde auch Rupicolin A-8-*O*-acetat für *A. gmelinii* zum ersten Mal beschrieben und anschließend aus *A. afra* isoliert (Jakupovic et al., 1988).

Da genügend Substanz zur Verfügung stand, wurde zusätzlich ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum aufgenommen. Anhand dieser Daten soll noch einmal auf die Struktur des Guaianolid-

typs eingegangen und die charakteristischen Signale hervorgehoben werden.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **26** zeigte die Signale von insgesamt 17 Kohlenstoffatomen (15 C-Atome des Sesquiterpens und 2 C-Atome der Acetylgruppe). Davon lagen zwei Signale bei  $\delta$  169.3 (C-16) und 170.1 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung für je eine Carbonylgruppe im Molekül standen. Hinzu kamen sechs Signale zwischen  $\delta$  117.5 und 144.0 ppm, die auf olefinische Kohlenstoffatome zurückzuführen waren. Mit Hilfe eines DEPT war der Hybridisierungsgrad der Atome bzw. der Substitutionsgrad mit Wasserstoffatomen bestimmbar. Zusammen mit den Aussagen aus dem C-H-COSY wurden die Exomethylenkohlenstoffe den Signalen bei  $\delta$  117.5 (C-14) und 122.5 ppm (C-13) zugeordnet. Das C-3, welches nur ein Proton aufwies, war ebenfalls mit Hilfe des DEPT zu bestimmen ( $\delta$  124.7 ppm). Kohlenstoffatome, die in Nachbarschaft ein Sauerstoffatom besitzen, liegen im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zwischen  $\delta$  60-90 ppm. In diesem Fall konnten mittels C-H-COSY die Lage der Signale für C-8 ( $\delta$  74.3 ppm), C-6 ( $\delta$  79.2 ppm) und C-1 ( $\delta$  84.5 ppm) bestimmt werden. Die Methylgruppen (C-15 und  $\text{COCH}_3$ ) lagen bei  $\delta$  17.6 bzw. 21.2 ppm. Die restlichen vier Signale konnten mit Hilfe des DEPT und C-H-COSY eindeutig zugeordnet werden ( $\delta$  36.3 (C-9), 45.9 (C-2), 48.0 (C-7) und 64.9 ppm (C-5)).

### Strukturaufklärung von Rupicolin B-8-O-acetat (**27**)

Auch das  $\Delta$ 9-Epimer von Rupicolin A-8-O-acetat (**26**) konnte aus *A. afra* isoliert werden. Die Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **27** für die Protonen an den Kohlenstoffen 8, 9 und 15 des Guaianolidgrundgerüsts sind im folgenden angegeben:  $\delta$  5.32 ppm, 1H, *m*, H-8,  $\delta$  5.46 ppm, 1H, *dd*,  $J = 1.1$  und 3.3 Hz, H-9,  $\delta$  1.93 ppm, 3H, *brs*,  $\text{CH}_3$ -15. Die Signale waren durch die endozyklische Doppelbindung wie erwartet ins Tieffeld verschoben. Die Masse von  $m/z$  304 bestätigte zusammen mit Literaturdaten (Greger et al., 1986) die Vermutung, dass **27** mit dem Naturstoff Rupicolin B-8-O-acetat (Abb. 2.20) identisch war. Wie schon **26** wurde auch **27** für *A. afra* bereits von Jakupovic et al. (1988) beschrieben.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **27** unterschied sich von dem von **26** vor allem in der Lage der Kohlenstoffe 9, 10 und 14. Das Verschieben der Doppelbindung machte sich wie folgt bemerkbar: Im Spektrum erschien ein zusätzliches Signal für die 14-Methylgruppe bei  $\delta$  24.5 ppm. Das Signal von C-9 wurde weit ins Tieffeld verschoben ( $\delta$  122.8 ppm). C-10 zeigte die charakteristische Verschiebung eines  $\text{sp}^2$ -hybridisierten Kohlenstoffes. Die eindeutige Zuordnung der Signale für C-4 und C-10 war nicht möglich, da beide Signale dicht beieinander lagen ( $\delta$  140.9 und 141.6 ppm).

### Strukturaufklärung von 11,13-Dehydromatricarin (**28**)

Das EI-Massenspektrum von **28** zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  302 und die Abspaltung einer Acetatgruppe durch das Fragment bei  $m/z$  244 an.

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum war das Vorhandensein einer Acetateinheit durch das Signal bei  $\delta$  2.16 ppm (3H, *s*) zu erkennen. Im Molekül waren weiterhin zwei isolierte Methylgruppen ( $\delta$  2.34 ppm, 3H, *brs*,  $\delta$  2.45 ppm, 3H, *brs*), eine Exomethylengruppe ( $\delta$  5.65 ppm, 1H, *d*,  $J = 3.0$  Hz,  $\delta$  6.23 ppm, 1H, *d*,  $J = 3.0$  Hz) und ein isoliertes olefinisches Proton bei  $\delta$  6.20 ppm (1H, *brs*) enthalten. Es fanden sich ebenfalls die Signale für H-8 und H-9 ( $\delta$  4.92 ppm, 1H, *dt*,  $J = 2.1$  und 10.0 Hz, H-8,  $\delta$  2.47 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2$  und 13 Hz, H-9b,

$\delta$  2.72 ppm, 1H, *dd*,  $J = 10$  und 13 Hz, H-9a), wie sie auch bei den anderen Guaianoliden **22**, **23** und **26** vorkamen.

Im Vergleich zu **26** fehlten zwei Masseeinheiten, vermutlich durch den Wegfall zweier Protonen einer Methylengruppe. Die auffällige Verschiebung der beiden Methylgruppen ins Tieffeld war ebenfalls ein Hinweis auf eine stark elektronenziehende Partialstruktur. Darauf basierend wurde eine Struktur formuliert, die zusätzlich zu den benachbarten Doppelbindungen ( $\Delta 3$  und  $\Delta 10$ ) eine Carbonylfunktion (C-2) in Konjugation aufwies. Der Vergleich mit Literaturdaten (Bohlmann und Zdero, 1978) ergab, dass es sich bei Verbindung **28** (Abb. 2.20) um 11,13-Dehydromatricarin handelte. Dieser Naturstoff wurde erstmals in den oberirdischen Pflanzenteilen von *Athanasia coronopifolia*, HARV., Asteraceae, gefunden und war bislang nicht aus *A. afra* isoliert worden.

### Strukturaufklärung von Eudesmaafraglaucolid (29)

Das EI-Massenspektrum von **29** zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  364. Anhand der Fragmente bei  $m/z$  304 und 244 konnte auf zwei Acetateinheiten im Molekül geschlossen werden. Vermutlich handelte es sich auch hier um ein Sesquiterpen.

Die Lage der Protonensignale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum unterschied sich allerdings von denen der Guaianolide **22-27**. Es mußte demnach ein anderer Grundtyp vorliegen. So waren insgesamt die Signale von 23 Protonen zu erkennen, wovon neun einer Methylgruppe ( $\delta$  0.94 ppm, 3H, *s*) und zwei Acetylgruppen ( $\delta$  2.07 ppm, 3H, *s*,  $\delta$  2.14 ppm, 3H, *s*) zugeordnet wurden. Zusätzlich lagen die Protonen einer Exomethylengruppe bei  $\delta$  5.13 und 5.27 ppm (je 1H, *brs*) vor. Fünf Protonen mußten aufgrund ihrer chemischen Verschiebung einem Sauerstoffatom benachbart sein ( $\delta$  3.53 - 5.13 ppm). Um die Kopplungspartner zuordnen zu können, wurde ein H-H-COSY-Spektrum aufgenommen. Das Doppeldublett bei  $\delta$  3.53 ppm ( $J = 4.5$  und 11.8 Hz) zeigte Korrelationen zu zwei Signalen bei  $\delta$  1.66 (1H, *m*) und 2.23 ppm (1H, *dd*,  $J = 4.5$  und 11.3 Hz), die selbst miteinander koppelten und somit die vicinalen Protonen einer Methylengruppe darstellten. Beide Signale korrelierten zusätzlich mit dem breiten Dublett bei  $\delta$  5.13 ppm, das aufgrund seiner Tieffeldverschiebung benachbart zu einer der Acetylgruppen stehen mußte. Die Dubletts bei  $\delta$  4.78 (1H, *d*,  $J = 12.6$  Hz) und 4.82 ppm (1H, *d*,  $J = 12.6$  Hz) zeigten neben einer identischen Kopplungskonstante ebenfalls einen ausgeprägten Dacheffekt, weitere Kopplungspartner waren nicht erkennbar. Hilfe gab hier ein HMBC-Spektrum, demnach zeigten beide Protonen eine Long-Range-Kopplung zum Carbonylatom der Acetylgruppe bei  $\delta$  2.07 ppm ( $\delta$  165 ppm,  $\text{COCH}_3$ ). Im Molekül mußte laut HMBC-Spektrum eine weitere Carbonylgruppe ( $\delta$  170 ppm) vorhanden sein, da sich auch hier Korrelationen zu den Signalen bei  $\delta$  4.82 und 5.02 ppm (1H, *d*,  $J = 11.0$  Hz) zeigten. Ausgehend von der Vermutung, dass ein Laktoring und zwei weitere Methylengruppen ( $\delta$  1.27 ppm, 1H, *m*,  $\delta$  2.30 ppm, 1H, *ddd*,  $J = 1.5, 4.2$  und 13.4 Hz,  $\delta$  2.46 ppm, 1H, *ddd*,  $J = 5.8, 14.2$  und 14.2 Hz,  $\delta$  3.07 ppm, 1H, *ddd*,  $J = 1.5, 3.0,$  und 14.2 Hz) im Molekül vorlagen, konnte die Struktur eines Eudesmanolids formuliert werden. Das letzte Proton bei  $\delta$  1.77 ppm (1H, *brd*,  $J = 11.0$  Hz) stand in Nachbarschaft zum H-6 ( $\delta$  5.02 ppm), das wiederum in Nachbarschaft zum Laktoring stehen mußte. Die Daten von **29** stimmten mit denen von Eudesmaafraglaucolid (Abb. 2.20), das zum ersten Mal (Jakupovic et al., 1988) aus *A. afra* von isoliert wurde, überein. Somit konnte dieser Naturstoff erneut aus dem Kraut isoliert werden.

### 2.2.5.2 Strukturaufklärung der Flavonoide 30-36

Neben den für Asteraceen typischen Sesquiterpenen konnten aus dem lipophilen Extrakt der Krautdroge zusätzlich sechs Flavone und ein Flavonolderivat isoliert und aufgeklärt werden (Kap. 5.6.1). Die Strukturen wurden anhand von EI-MS- und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sowie NOE-Experimenten aufgeklärt. Lagen keine Literaturdaten zum abschließenden Vergleich vor, so wurde die Struktur nach allgemein gültigen Regeln (Markham und Mabry, 1975) bestimmt. Da die Verbindungen strukturell nah verwandt waren, werden zunächst die typischen spektroskopischen Daten der Flavone am Beispiel von Apigenin (**30**) erläutert. Die Strukturaufklärung der Folgeverbindungen wird entsprechend der bestehenden Unterschiede verkürzt dargestellt.

#### Strukturaufklärung von Apigenin (**30**)

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte das Signal für ein isoliertes Proton bei  $\delta$  6.64 ppm (1H, s). Zwei weitere Signale lagen bei  $\delta$  6.26 ppm (1H, d,  $J = 2.0$  Hz) und  $\delta$  6.54 ppm (1H, d,  $J = 2.0$  Hz). Diese beiden aromatischen Protonen mußten aufgrund der kleinen Kopplungskonstante in *meta*-Stellung zueinander stehen. Zusammen mit dem Signal bei  $\delta$  13.02 ppm, bedingt durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxygruppe an C-5 mit der Carbonylfunktion an C-4, konnte auf eine Flavonoidstruktur geschlossen werden. Im Gegensatz zu den Isoflavonen ist bei den Flavonen das Signal des isolierten Protons an C-3 des C-Ringes hochfeldverschoben. Desweiteren konnte man die Signale eines AA'BB'-Systems bei  $\delta$  7.03 ppm (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3'/5') und  $\delta$  7.95 ppm (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2'/6') für den *para*-substituierten B-Ring des Flavons erkennen. Methoxygruppen konnten nicht nachgewiesen werden.

Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  270. Dieser bestätigte die Annahme, dass es sich bei Verbindung **30** um 5,7,4'-Trihydroxyflavon (Apigenin, Abb. 2.21) handelte. Zusätzlich konnte dieser ubiquitär vorkommende Naturstoff durch den direkten Datenvergleich mit Apigenin (Roth) abgesichert werden.

#### Strukturaufklärung von Acacetin (**31**)

Das Kopplungsmuster der Signale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **31** ähnelte dem von **30**, so dass vermutlich auch hier ein 5,7,4'-trisubstituiertes Flavon vorlag. Das Singulett bei  $\delta$  3.92 ppm indizierte das Vorhandensein einer Methoxygruppe. Durch die erkennbare Tiefeldverschiebung der Protonensignale des *para*-substituierten Aromaten ( $\delta$  7.13 ppm, 2H, d,  $J = 8.9$  Hz, H-3'/5',  $\delta$  8.02 ppm, 2H, d,  $J = 8.9$  Hz, H-2'/6') konnte auf eine Methoxygruppe im Ring B des Flavons geschlossen werden. Die Signale des A-Ringes zeigten keine Verschiebungen im Vergleich zu **30**. Der Molekülionpeak im EI-MS-Spektrum bei  $m/z$  284 bestätigte, dass es sich bei **31** um ein *O*-methyliertes Apigeninderivat handelte. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit Literaturwerten (Silva und Mundaca, 1971) bestätigte die Struktur von 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon (Acacetin, **31**, Abb. 2.21).

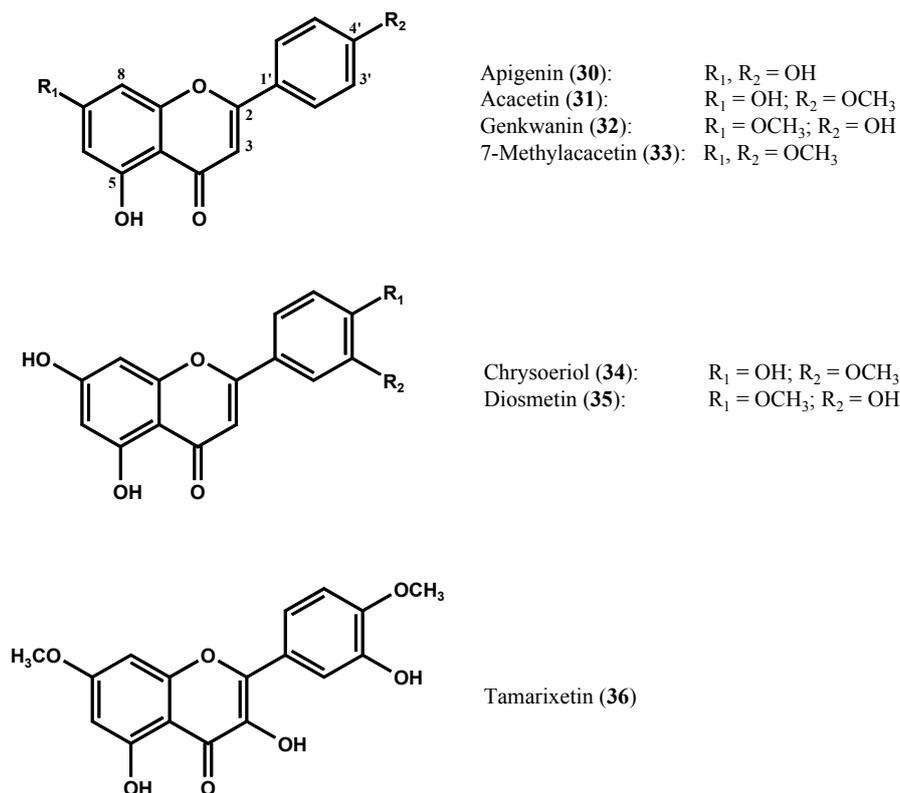


Abbildung 2.21: Strukturen der aus *Artemisia afra* isolierten Flavonoide **30-36**.

### Strukturaufklärung von Genkwanin (**32**)

Auch bei Verbindung **32** handelte es sich um ein methyliertes Derivat des Apigenins (**30**). Die Methoxygruppe lag im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erneut bei  $\delta$  3.92 ppm (3H, *s*), diesmal zeigten sich allerdings Abweichungen bei den Signalen des A-Ringes ( $\delta$  6.32 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz, H-6,  $\delta$  6.69 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz, H-8). Daraus konnte geschlossen werden, dass sich die Methoxygruppe diesmal im Ring A befand. Diese Vermutung wurde durch das Auftreten des Fragments bei  $m/z$  167 im EI-Massenspektrum (s. a. Abb. 2.3) zusätzlich bestärkt. Da die freie Hydroxygruppe an C-5 durch das Singulett bei  $\delta$  12.98 ppm eindeutig nachweisbar war, blieb nur Position 7 des Moleküls für die Methoxygruppe. Der Vergleich mit Literaturdaten (Brieskorn und Michel, 1968) bestätigte endgültig die Struktur von **32** als 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon (Genkwanin, Abb. 2.21). Genkwanin (**32**) war schon aus früheren Arbeiten über *A. afra* bekannt (Wollenweber und Mann, 1989)

### Strukturaufklärung von 7-*O*-Methylacacetin (**33**)

Verbindung **33** wies im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zwei Methoxygruppen auf ( $\delta$  3.93 und 3.94 ppm, je 3H, *s*). Das Substitutionsmuster war identisch mit dem der drei oben genannten Flavone **30-32**. Die Werte für den A-Ring lagen bei  $\delta$  6.34 (1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz, H-6) und 6.71 ppm (1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz, H-8), die für den *para*-substituierten B-Ring bei  $\delta$  7.14 (2H,

$d$ ,  $J = 8.9$  Hz, H-3'/5') und 8.06 ppm (2H,  $d$ ,  $J = 8.9$  Hz, H-2'/6'). Da auch hier der Nachweis für eine freie 5-Hydroxygruppe vorlag ( $\delta$  12.96 ppm, 1H,  $s$ ), konnte für **33** die Struktur von 4',7-Dimethoxy-5-hydroxyflavon (7-*O*-Methylacacetin, Abb. 2.21) postuliert werden. Dies konnte sowohl durch die Masse (298 [M]<sup>+</sup>, 166 [Fragment Ring A]<sup>+</sup>, 135 [Fragment Ring B]<sup>+</sup>), als auch durch den Vergleich mit Daten von Silva und Mundaca (1971) bestätigt werden. Wie schon **32** wurde auch **33** für *A. afra* bereits von Jakupovic et al. (1988) und Nkunya et al. (1992) beschrieben.

### Strukturaufklärung von Chrysoeriol (34)

Während im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **34** erneut das gleiche Substitutionsmuster wie bei den vorher genannten Flavonen für den A-Ring ( $\delta$  6.21 ppm, 1H,  $d$ ,  $J = 2.0$  Hz, H-6,  $\delta$  6.47 ppm, 1H,  $d$ ,  $J = 2.0$  Hz, H-8) zu erkennen war, mußte der B-Ring aufgrund des Kopplungsmusters der restlichen drei aromatischen Protonen ( $\delta$  6.94 ppm, 1H,  $d$ ,  $J = 8.2$  Hz, H-5',  $\delta$  7.49 ppm, 1H,  $d$ ,  $J = 1.9$  Hz, H-2',  $\delta$  7.51 ppm, 1H,  $dd$ ,  $J = 1.9$  und 8.2 Hz, H-6') 1,2,4-trisubstituiert sein. Das Singulett von H-3 lag bei  $\delta$  6.59 ppm (1H), das der Methoxygruppe bei  $\delta$  3.96 ppm (3H). Da das Spektrum diesmal in deuteriertem MeOH aufgenommen wurde, konnte aufgrund des Wasserstoffaustausches der freien Hydroxygruppen mit Deuterium kein Signal bei  $\delta$  12-13 ppm erkannt werden. Dass sich die Methoxygruppe dennoch im Ring B befinden mußte, konnte erneut mit Hilfe der Fragmente aus dem EI-MS-Spektrum geklärt werden (300 [M]<sup>+</sup>, 153 [Fragment Ring A]<sup>+</sup>, 148 [Fragment Ring B]<sup>+</sup>). Eine zusätzliche Bestätigung brachten NOE-Experimente: die Einstrahlung in das Signal bei  $\delta$  3.96 ppm führte zu einer Signalvergrößerung des Dubletts bei  $\delta$  7.49 ppm (H-2'). Daraus ergab sich für **34** die Struktur von 3'-Methoxy-4',5,7-trihydroxyflavon (Chrysoeriol, Abb. 2.21). Literaturdaten zum Vergleich lagen nicht vor.

### Strukturaufklärung von Diosmetin (35)

Die <sup>1</sup>H-NMR- und EI-MS-Spektren von **35** glichen denen von **34**. Auch hier befand sich eine Methoxygruppe im Molekül ( $\delta$  3.94 ppm, 3H,  $s$ ). Unterschiede ergaben sich für den Ring B des Flavonmoleküls ( $\delta$  7.08 ppm, 1H,  $d$ ,  $J = 8.6$  Hz, H-5',  $\delta$  7.39 ppm, 1H,  $d$ ,  $J = 2.1$  Hz, H-2',  $\delta$  7.51 ppm, 1H,  $dd$ ,  $J = 2.1$  und 8.6 Hz, H-6'). Daraus konnte für Verbindung **35** auf ein Stellungsisomer von Chrysoeriol (**34**) geschlossen werden. Ein erneutes NOE-Experiment bestätigte den Verdacht. Die Einstrahlung in das Signal bei  $\delta$  3.94 ppm führte zu einer Signalvergrößerung des Dubletts bei  $\delta$  7.08 ppm (H-5'). Verbindung **35** konnte folglich als 4'-Methoxy-3',5,7-trihydroxyflavon (Diosmetin, Abb. 2.21) identifiziert werden. Auch hier lagen keine Literaturdaten zum Vergleich vor.

### Strukturaufklärung von Tamarixetin (36)

Bei Verbindung **36** handelte es sich ebenfalls um ein Flavonoid. Allerdings fehlte im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum das Signal für das Proton an C-3, so dass man in diesem Fall von einem Flavonol ausgehen konnte. Der A-Ring wurde durch das Vorhandensein einer freien Hydroxygruppe an C-5 ( $\delta$  13.07 ppm, 1H,  $s$ ) sowie durch zwei *meta*-ständige Protonen an C-6 und C-8 ( $\delta$  6.06 ppm, 1H,  $brs$ ,  $\delta$  6.56 ppm, 1H,  $brs$ ) charakterisiert. Der B-Ring zeigte

das Kopplungsmuster eines 1,3,4-substituierten Aromaten ( $\delta$  7.04 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-5',  $\delta$  7.33 ppm, 1H, *d*,  $J = 1.5$  Hz, H-2',  $\delta$  7.04 ppm, 1H, *dd*,  $J = 1.5$  und 8.4 Hz, H-6'). Das Molekül enthielt zwei Methoxygruppen, die aufgrund des Fragmentationsmusters im EI-MS-Spektrum ( $m/z$  330  $[M]^+$ , 166 [Fragment Ring A] $^+$ , 164 [Fragment Ring B] $^+$ ) jeweils in einem der Ringe vorhanden sein mußten. Die genaue Zuordnung der Position erfolgte über Messung der NOE-Effekte. Einstrahlungen in die Signale bei  $\delta$  4.05 und 4.00 ppm führte jeweils zu einer Signalvergrößerung der Dubletts bei  $\delta$  6.06 (H-6) und 6.56 ppm (H-8) sowie des Dubletts bei  $\delta$  7.04 ppm (H-5'). Somit konnte **36** als 3',5-Dihydroxy-4',5-dimethoxyflavonol (Tamarixetin, Abb. 2.21) identifiziert werden.

### 2.2.5.3 Strukturaufklärung des Cumarins **37**

Aus dem lipophilen Krautextrakt von *A. afra* konnte aus mehreren Fraktionen Verbindung **37** isoliert werden (Kap. 5.6.1). Die Struktur wurde mit Hilfe von  $^1\text{H-NMR}$ - und EI-MS-Spektren sowie durch den direkten Datenvergleich mit einer authentischen Probe aufgeklärt.

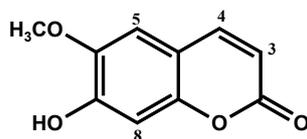


Abbildung 2.22: Struktur von Scopoletin (**37**), isoliert aus *Artemisia afra*.

### Strukturaufklärung von Scopoletin (**37**)

Das EI-Massenspektrum von **37** zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  192  $[M]^+$ . Das Fragment bei  $m/z$  177 zeigte den Verlust einer Methylgruppe an. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten eine Methoxygruppe bei  $\delta$  3.95 ppm (3H, *s*) sowie zwei isolierte aromatische Protonen bei  $\delta$  6.84 und 6.92 ppm (je 1H, *s*) nachgewiesen werden. Die restlichen zwei Signale entsprachen jeweils einem olefinischen Proton und bildeten jeweils ein Dublett bei  $\delta$  7.27 und 7.59 ppm aus. Die Kopplungskonstante von  $J = 9.5$  Hz deutete auf eine *cis*-Doppelbindung hin. Zusammen mit der Beobachtung, dass die Substanz im ultravioletten Licht (366 nm) eine stark blaue Fluoreszenz zeigte, konnte auf ein Cumarinderivat geschlossen werden. Die isolierten Protonen wurden H-5 und H-8 zugeordnet. Schließlich mußte noch die Position der Methoxygruppe bestimmt werden. Dies erfolgte über den direkten Vergleich mit Scopoletin (Roth). Verbindung **37** wurde somit als 7-Hydroxy-6-methoxycumarin (Scopoletin) identifiziert. Dieses Cumarinderivat wurde neben Isoscopoletin schon in früheren Arbeiten von Jakupovic et al. (1988) aus dem Kraut von *A. afra* isoliert.

## 2.2.6 Pharmakologische Untersuchung von *Artemisia afra*

### *In-vitro*-Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*

Die antiplasmodialen Aktivitäten der Rohextrakte und isolierten Verbindungen aus *A. afra* sind in Tabelle 2.10 wiedergegeben.

Während die methanolischen und wässrigen Krautextrakte keine Aktivität aufwiesen, zeigte der lipophile Extrakt eine gute Aktivität gegen *P. falciparum* (IC<sub>50</sub>-Werte: 8.9 µg/ml [PoW], 15.3 µg/ml [Dd2]).

**Tabelle 2.10:** *In-vitro*-Aktivität von Extrakten und isolierten Naturstoffen aus dem Kraut von *Artemisia afra* gegen *Plasmodium falciparum*.

Extrakt/isolierter Naturstoff	IC <sub>50</sub> -Werte <sup>a</sup>			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
<i>Extrakte</i>				
Lipophiler Extrakt	8.9	-	15.3	-
Hydrophiler Extrakt	> 50	-	> 50	-
Wässriger Extrakt	> 100	-	> 100	-
<i>Sesquiterpenlaktone</i>				
1α,4α-Dihydroxy-bishopsoliceolid ( <b>22</b> )	8.6	26.9	11.7	36.5
1α,4α,8α-Trihydroxyguaia-2,9,11(13)-trien-12,6α-olid-8- <i>O</i> -acetat ( <b>23</b> )	30.9	96.5	20.4	63.7
1-Desoxy-1α-peroxy-rupicolin A-8- <i>O</i> -acetat ( <b>24</b> )	8.7	27.2	17.5	54.6
Rupicolin A-8- <i>O</i> -acetat ( <b>26</b> )	12.5	41.1	10.8	35.5
Rupicolin B-8- <i>O</i> -acetat ( <b>27</b> )	20.1	66.0	31.8	104.0
11,13-Dehydromatricarin ( <b>28</b> )	17.9	59.2	12.5	41.3
Eudesmaafraglaucolid ( <b>29</b> )	47.5	147.0	> 50	> 188
<i>Flavonoide</i>				
Apigenin ( <b>30</b> )	14.6	54.1	25.0	92.6
Acacetin ( <b>31</b> )	<b>5.5</b>	<b>19.4</b>	<b>12.6</b>	<b>44.3</b>
Genkwanin ( <b>32</b> )	<b>5.5</b>	<b>19.4</b>	<b>8.1</b>	<b>28.5</b>
7- <i>O</i> -Methylacacetin ( <b>33</b> )	<b>4.3</b>	<b>14.4</b>	<b>7.0</b>	<b>23.5</b>
Tamarixetin ( <b>36</b> )	33.9	103.0	33.0	100.0
<i>Cumarine</i>				
Scopoletin ( <b>37</b> )	24.0	125.0	n.b.	-
<i>Kontrolle</i>				
Artemisinin	0.0008	0.003	0.004	0.015
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.008	0.015	0.073	0.14

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten

n.b.: nicht bestimmt

Für die drei methylierten Derivate des Apigenins **31**, **32** und **33** konnten die höchsten *in-vitro*-Aktivitäten gegen *P. falciparum* festgestellt werden (IC<sub>50</sub>-Werte: 5.5, 5.5 und 4.3 µg/ml [PoW], 12.6, 8.1 und 7.0 µg/ml [Dd2]). Die Flavone **31** bis **33** zeigten eine zwei- bis dreifach höhere Aktivität als 4',5,7-Trihydroxyflavon (**30**, IC<sub>50</sub>-Werte: 14.6 µg/ml [PoW], 25.0 µg/ml [Dd2]). Die IC<sub>50</sub>-Werte von Chrysoeriol (**34**) und Diosmetin (**35**) konnten aufgrund der geringen isolierten Substanzmengen nicht bestimmt werden. Tamarixetin (**36**) erwies sich als inaktiv (IC<sub>50</sub>-Werte > 30 µg/ml).

Unter den Sesquiterpenen wiesen die Guaianolide 1α,4α-Dihydroxybishopsolicolid (**22**), 1-Desoxy-1α-peroxy-rupicolin A-8-*O*-acetat (**24**) und Rupicolin A-8-*O*-acetat (**26**) ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte wie der lipophile Rohextrakt auf. Die Terpenoide sind aber, sieht man sich die molaren Werte an, nur als moderat aktiv zu bezeichnen (IC<sub>50</sub>-Werte: 26.9, 27.2 und 41.1 µM [PoW], 36.5, 54.6 und 35.5 µM [Dd2]). Offensichtlich führt eine Exomethylengruppe an C-10 zu einer Wirkverstärkung, denn die Δ9-Epimere von **22** und **26** (**23** und **27**) zeigten keine *in-vitro*-Aktivität (IC<sub>50</sub>-Werte: > 50 µM). Trotz seiner Peroxid-Partialstruktur besaß **24** keine verstärkte Wirksamkeit verglichen mit den übrigen Sesquiterpenlaktonen. 1-Desoxy-1α-peroxy-rupicolin B-8-*O*-acetat (**25**) konnte aufgrund der geringen Substanzmenge nicht getestet werden. Während 11,13-Dehydromatricarin (**28**) ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte wie die Δ10-Epimere (**23,27**) zeigte, erwies sich Eudesmafraglaucolid (**29**) als inaktiv (IC<sub>50</sub>-Werte > 40 µg/ml).

Das Cumarinderivat **37** zeigte ebenfalls keine bemerkenswerte Aktivität.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Flavone als auch Sesquiterpenlaktone für die antiplasmodiale Wirkung des lipophilen Extrakts der oberirdischen Teile von *A. afra* verantwortlich sind. Im Unterschied zu Artemisinin aus *A. annua* zeigt aber keine der isolierten Substanzen außergewöhnliche antiplasmodiale Eigenschaften. Offensichtlich lässt sich die Aktivität des Rohextraktes keiner definierten Substanz zuordnen, sondern beruht eher auf einem komplexen Substanzgemisch, dessen Bestandteile additiv oder sogar synergistisch wirksam sind. Hinzu kommt, dass sich bei der Aufarbeitung des Extraktes keine Fraktion durch besonders hohe Aktivität auszeichnete, sondern immer mehrere Fraktionen gleiche IC<sub>50</sub>-Werte aufwiesen, was die Aufarbeitung erschwerte. Die isolierten Substanzen stellten die Hauptkomponenten der jeweiligen Fraktionen dar, die Nebenverbindungen konnten nicht erfaßt werden.

### ***In-vitro*-Aktivität gegen ECV-304-Zellen**

Die Zytotoxizitäten einiger ausgewählter Verbindungen sind in Tabelle 2.11 angegeben. Von den getesteten Sesquiterpenen erwiesen sich die beiden Rupicolin-Derivate **26** und **27** mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0.8 bzw. 2.5 µg/ml als am stärksten wirksam gegenüber der Zelllinie ECV-304. 1α,4α,8α-Trihydroxyguaia-2,9,11(13)-trien-12,6α-olid-8-*O*-acetat (**23**) zeigte selbst in Konzentrationen von 200 µg/ml keine Zellschädigungen. Dies ist bemerkenswert, unterscheidet sich **23** von **27** doch nur in der Lage der Doppelbindung im Cyclopentenring (Δ2 bzw. Δ3) und der Hydroxygruppe in Position 4. Beide Moleküle besitzen eine Exomethylengruppe an Position 10. Wie schon bei den antiplasmodialen Aktivitäten beobachtet, scheint auch hier eine Δ10-Exomethylengruppe die Wirkung zu verstärken, denn die Δ9-Derivate von **26** und **22** (**27** und **23**) zeigten vergleichsweise schwache Aktivitäten. 11,13-Dehydromatricarin (**28**) und Eudesmafraglaucolid (**29**) erwiesen sich als nicht zytotoxisch (IC<sub>50</sub>-Werte > 50 µM).

Von den drei getesteten Flavonoiden zeigte 7-*O*-Methylacacetin (**33**) die stärkste zytoto-

**Tabelle 2.11:** *In-vitro*-Aktivität einiger Sesquiterpenlaktone und Flavone, isoliert aus dem Kraut von *Artemisia afra*, gegen die Zelllinie ECV-304.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Werte <sup>a</sup>			SI <sup>b</sup>
	ECV-304		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	
<i>Sesquiterpenlaktone</i>				
1α,4α-Dihydroxybishopsolicolid ( <b>22</b> )	<b>5.3</b>	<b>16.6</b>	11.7	<b>0.45</b>
1α,4α,8α-Trihydroxyguaia-2,9,11(13)-trien-12,6α-olid-8- <i>O</i> -acetat ( <b>23</b> )	> 200	> 625.5	20.4	> 9.8
1-Desoxy-1α-peroxy-rupicolin A-8- <i>O</i> -acetat ( <b>24</b> )	<b>10.6</b>	<b>33.1</b>	17.5	<b>0.61</b>
Rupicolin A-8- <i>O</i> -acetat ( <b>26</b> )	<b>0.8</b>	<b>2.6</b>	10.8	<b>0.07</b>
Rupicolin B-8- <i>O</i> -acetat ( <b>27</b> )	<b>2.5</b>	<b>8.3</b>	31.8	<b>0.08</b>
11,13-Dehydromatricarin ( <b>28</b> )	25.7	85.1	12.5	2.10
Eudesmaafraglaucolid ( <b>29</b> )	60.4	188.0	> 50	< 1.21
<i>Flavone</i>				
Apigenin ( <b>30</b> )	22.2	82.2	25.0	0.89
Genkwanin ( <b>32</b> )	30.2	106.0	8.1	3.72
7- <i>O</i> -Methylacetin ( <b>33</b> )	7.1	23.8	7.0	1.01
<i>Kontrolle</i>				
Artemisinin	16.5	61.8	0.004	4125.0
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	30.0	58.1	0.073	411.0

<sup>a</sup> Anzahl der Experimente: 8 (ECV-304); 3 (Dd2)<sup>b</sup> Berechnung s. Kap. 5.4.5

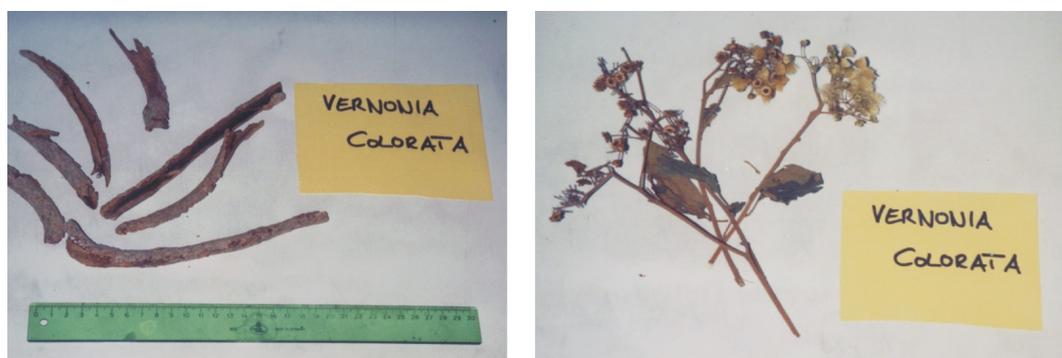
xische Wirkung mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 7.1 µg/ml. Auch hier scheint die Anzahl der Methoxygruppen für eine verstärkte Aktivität verantwortlich zu sein. So zeigte Apigenin (**30**) eine 50%ige Wachstumshemmung der Zellen bei 22.2 µg/ml und war somit etwa dreimal schwächer wirksam.

Zusammenfassend zeigten die isolierten Verbindungen in den meisten Fällen eine stärkere Aktivität gegen die ECV-304-Zelllinie als gegenüber *P. falciparum*. Eine Selektivität gegen den Malariaerreger konnte somit nicht beobachtet werden. Die antiplasmodiale Aktivität beruht, mit einzelnen Ausnahmen, offensichtlich auf einer allgemeinen Zytotoxizität.

### 2.2.7 Phytochemische Untersuchung von *Vernonia colorata*

Die große Gattung *Vernonia*, Asteraceae, umfasst mehr als 1500 Arten. Die verschiedenen Spezies sind im tropischen Amerika, Afrika und Asien verbreitet. Neben krautigen Pflanzen gibt es auch Sträucher oder kleine Bäume. Viele *Vernonia*-Arten werden in der Volksmedizin traditionell gegen die verschiedensten Krankheiten eingesetzt. An dieser Stelle sei auf einen Übersichtsartikel von Johri und Singh (1997) verwiesen, der auf die Verwendung ausgesuchter *Vernonia*-Arten und ihr pharmazeutisches Potential eingeht.

*Vernonia amygdalina* DEL., ein in den Tropen beheimateter Baum, wurde aufgrund seiner Bekanntheit als Arzneipflanze bereits sehr gut hinsichtlich seiner pharmakologischen Eigenschaften untersucht. Bemerkenswert ist, dass scheinbar auch Tiere diese Pflanze bei Erkrankungen fressen. So konnte man Schimpansen beobachten, die Blätter von *V. amygdalina* zu sich nehmen, wenn sie offensichtlich unter parasitären Erkrankungen leiden. Ohigashi et al. (1994) konnten aus *V. amygdalina* neben Steroidglykosiden auch Sesquiterpenlaktone isolieren, die gute *in-vitro*-Aktivitäten gegenüber *Schistosoma*-, *Plasmodium*- und *Leishmania*-Arten aufwiesen. Auch in unserem Testsystem wies der lipophile Extrakt aus den Wurzeln einen IC<sub>50</sub>-Wert von 19.0 µg/ml auf (Kap. 2.1.3). Neben antiparasitären Eigenschaften zeigten verschiedene aus dieser Pflanze isolierte Sesquiterpenlaktone, wie Vernodalin und Vernomygdin, auch eine Zytotoxizität gegenüber KB-Zellen (Kupchan et al., 1969) sowie antimikrobielle Eigenschaften (Al Magboul et al., 1997). Ganjian et al. (1983) testeten Vernodalol und sein 11,13-Dihydroderivat erfolgreich als Fraßschutz gegen eine afrikanische Wurmart.



**Abbildung 2.23:** Getrocknete Pflanzenteile von *Vernonia colorata* (WILLD.) DRAKE, Asteraceae.

*Vernonia colorata* (WILLD.) DRAKE (Abb. 2.23) ist in weiten Teilen Afrikas verbreitet. In der Sprache der Zulu heißt diese Pflanzenart 'Ibozane'. In Nigeria werden die Blätter aufgrund ihrer antipyretischen, expektorierenden und abführenden Eigenschaften als Dekokt in der Volksmedizin genutzt. Die Rinde der Wurzeln und Zweige wirkt adstringierend und hilft bei Fieber und Diarrhöe. In Tansania und im Sudan wird sie bei Husten, gastrointestinalen Beschwerden, Dysmenorrhöe und bakteriell bedingten Krankheiten eingesetzt (Watt und Breyer-Brandwijk, 1962; Neuwinger, 2000; Johri und Singh, 1997).

*V. colorata* ist ein Strauch oder Baum, der eine Höhe von bis zu 7.5 m erreichen kann. Die Rinde ist grau bis braun. Die ovalen Blätter sind 5 bis 36 cm lang und 3 bis 13 cm breit. Die Blütenköpfchen sind trugdoldig angeordnet, die dazugehörigen 3 bis 25 mm

langen Stiele dicht behaart. Pro Blütenköpfchen findet man 10 bis 26 Einzelblüten. Die Blütenkrone ist weißlich, manchmal schwach malvenfarbig und wird bis zu 12 mm lang. Die Naturstoffe, die bisher aus den Blättern isoliert werden konnten, sind hauptsächlich Sesquiterpenlaktone (Toubiana und Gaudemer, 1967; Zdero et al., 1991; Rabe et al., 2002). Einige davon wurden auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften hin untersucht (Rabe et al., 2002). So zeigten z. B. Vernolid und Vernodalol eine Wachstumshemmung bei einigen gram-positiven Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* oder *Bacillus subtilis* (Minimale Hemmkonzentration: 0.1-0.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Vernolid zeigte darüber hinaus eine mit Metronidazol vergleichbare amoebizide Wirkung (Gasquet et al., 1985). Bislang wurde diese Pflanzenart noch nicht auf ihre antiplasmodiale Aktivität untersucht.

Im Rahmen der Untersuchungen von neun Heilpflanzen aus Zimbabwe, die traditionell zur Therapie der Malaria eingesetzt werden, zeigte der Extrakt aus den Blättern ( $\text{IC}_{50}$ -Werte: 12.1  $\mu\text{g/ml}$  [PoW], 17.8  $\mu\text{g/ml}$  [Dd2], Kap. 2.1) von *V. colorata* eine gute *in-vitro*-Aktivität. Durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung konnten vier Verbindungen aus den aktiven Fraktionen (Angabe der  $\text{IC}_{50}$ -Werte s. Kap. 5.7.1) isoliert werden. Im folgenden Abschnitt soll zunächst auf die Strukturaufklärung dieser Naturstoffe eingegangen werden, bevor die biologischen Aktivitäten der einzelnen Verbindungen behandelt werden.

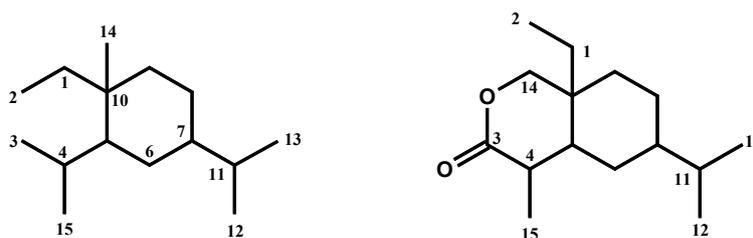
### 2.2.7.1 Strukturaufklärung der Sesquiterpenlaktone 38-41

Nach dem Extrahieren der Blattdroge von *V. colorata* mit PE/Diethylether/MeOH (1:1:1 [V/V/V]) und Fraktionierung des Extraktes in neun Fraktionen, konnten aus Fraktion 8 insgesamt vier Naturstoffe isoliert werden, die den Sesquiterpenen zuzuordnen waren (Kap. 5.7.1). Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe von EI-MS-, FAB-MS-,  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sowie zweidimensionalen Messmethoden. Da es sich um bekannte Naturstoffe handelte und die isolierten Strukturen anhand von Literaturdaten gut identifizierbar waren, wurden die Konfigurationen der einzelnen Protonen im jeweiligen Molekül aus den Originalarbeiten übernommen. Zudem waren alle Strukturen schon für *V. colorata* beschrieben worden. Interessanterweise ließen sich aus den aktiven Fraktionen keine Flavonoide isolieren.

#### Strukturaufklärung von Vernodalol (38)

Das EI-Massenspektrum von Verbindung **38** zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  392. Dies entsprach einer Summenformel von  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_8$ .

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum deuteten die Signale bei  $\delta$  1.62 und 2.07 ppm (je 1H, *dd*,  $J = 11.0$  und 14.0 Hz, *dd*,  $J = 4.8$  und 14.0 Hz) sowie bei  $\delta$  4.36 und 4.68 ppm (je 1H, *dd*,  $J = 1.6$  und 11.8 Hz, *d*,  $J = 11.8$  Hz) aufgrund ihrer Kopplungskonstanten auf das Vorhandensein zweier Methylengruppen im Molekül hin, von denen eine aufgrund ihrer chemischen Verschiebung zu einem Sauerstoffatom benachbart sein mußte. Dies galt ebenso für die Protonen der Signale bei  $\delta$  4.11, 4.26 und 5.35 ppm (korrespondierende C-Atome bei  $\delta$  68.9, 62.3 bzw. 69.3 ppm). Die Verschiebung des Protonensignals bei  $\delta$  5.35 ppm ins Tieffeld war zudem ein Hinweis auf eine Estergruppe in Nachbarschaft. Aufgrund der Lage und Kopplungsmuster der Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ließen sich weitere Partialstrukturen formulieren. So lagen ein Methylester, erkennbar durch ein Singulett bei  $\delta$  3.77 ppm



**Abbildung 2.24:** Grundstrukturen des Eleman- (links) und des Elemanolid-Typs (rechts) bei Sesquiterpenen.

(3H) und insgesamt drei Exomethylengruppen ( $\delta$  5.75 / 6.34 ppm,  $\delta$  5.76 / 6.63 ppm und  $\delta$  5.82 / 6.17 ppm, jeweils 1H, *brs*) im Molekül vor. Zudem zeigte das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum das Vorhandensein einer Vinylgruppe ( $\delta$  5.23 ppm, 1H, *d*,  $J = 10.6$  Hz,  $\delta$  5.24 ppm, 1H, *d*,  $J = 17.5$  Hz,  $\delta$  5.69 ppm, 1H, *dd*,  $J = 10.6$  und 17.5 Hz) an.

Aufgrund vorangegangener Arbeiten (Toubiana und Gaudemer, 1967; Zdero et al., 1991; Rabe et al., 2002) wurde für **38** als Sesquiterpengrundgerüst ein Elemangrundkörper mit einem Laktoring zwischen C-3 und C-14 (Elemanolid, Abb. 2.24) postuliert. Die entsprechenden Signale ließen sich daraufhin gut zuordnen.

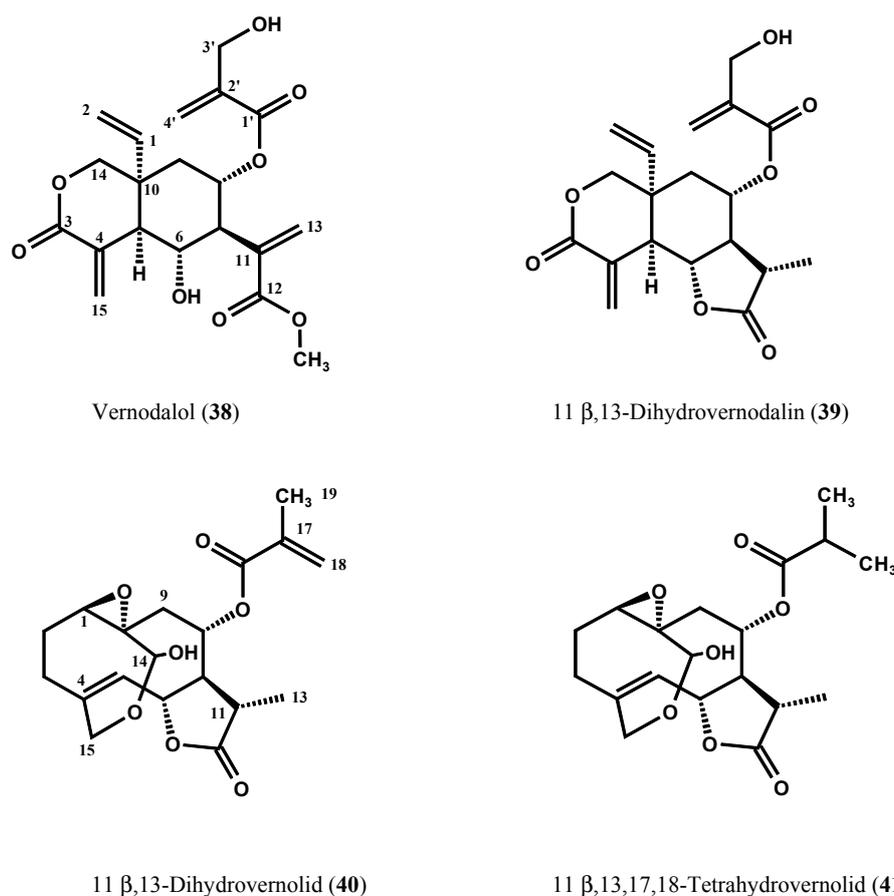
Aufgrund der hohen Molekularmasse konnte man davon ausgehen, dass neben dem Methyl ester ein größerer Acylrest vorlag. Die bisher aus verschiedenen *Vernonia*-Arten bekannten Terpenoide weisen häufig  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonsäuren wie Angelikasäure oder Acrylsäurederivate als Acylkomponente auf (Jakupovic et al., 1985, 1987). In diesem Fall handelte es sich um Hydroxymethacrylsäure ( $\delta$  4.26 ppm, 2H, *s*, H-3',  $\delta$  5.82 ppm, 1H, *brs*, H-4'a,  $\delta$  6.17 ppm, 1H, *brs*, H-4'b). Dies konnte durch die Fragmente bei  $m/z$  290  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3]^+$  bzw. 85  $[\text{CO}-\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})=\text{CH}_2]^+$  im EI-MS bestätigt werden.

Es ergab sich für **38** damit die Struktur von Vernodalol (Abb. 2.25), das erstmals aus den Samen von *Vernonia anthelminthica* (L.) WILLD. isoliert wurde (Asaka et al., 1977). Der Vergleich mit Literaturdaten erfolgte sowohl anhand älterer Arbeiten von Asaka et al. (1977), als auch anhand neuerer Daten für das 8-Desacylderivat (Jakupovic et al., 1985; Keriko et al., 1995).

### Strukturaufklärung von 11 $\beta$ ,13-Dihydrovernodalin (**39**)

Die Molmasse von Verbindung **39** lag bei  $m/z$  362, was einer Summenformel von  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_7$  entsprach. Auch hier fanden sich Fragmente, welche auf die Abspaltung eines Hydroxymethacrylsäurerestes hindeuten ( $m/z$  85).

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum konnten Ähnlichkeiten mit dem Spektrum von **38** festgestellt werden. So zeigten sich die Signale für die beiden Methylengruppen im Elemanolidgrundgerüst ( $\delta$  1.71 ppm, 1H, *dd*,  $J = 10.8$  und 14.2 Hz, H-9b,  $\delta$  2.10 ppm, 1H, *dd*,  $J = 4.6$  und 14.2 Hz, H-9a,  $\delta$  4.28 ppm, 1H, *dd*,  $J = 1.8$  und 12.1 Hz, H-14a,  $\delta$  4.52 ppm, 1H, *d*,  $J = 12.1$  Hz, H-14b) sowie die Signale für die Vinylgruppe ( $\delta$  5.29 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2.0$  und 10.8 Hz, H-2a,  $\delta$  5.31 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2.0$  und 17.7 Hz, H-2b,  $\delta$  5.73 ppm, 1H, *dd*,  $J = 10.8$  und 17.7 Hz, H-1). Die Verschiebungen der Acylkomponente waren nahezu identisch. Es fehlten im Vergleich zu Verbindung **38** die Signale für den Methyl ester sowie die dritte Exomethylengruppe.



**Abbildung 2.25:** Strukturen der aus *Vernonia colorata* isolierten Sesquiterpenlaktone **38-41** (relative Konfiguration).

Dafür erschien das Signal einer Methylgruppe bei  $\delta$  1.42 ppm (3H, *d*,  $J = 6.9$  Hz). Eine freie Säurefunktion im Molekül konnte mit einem (+)-FAB-Massenspektrum ausgeschlossen werden ( $m/z$  363  $[M+H]^+$ ). Somit lag ein weiterer Laktonring (C-6 und C-12) vor. Während das Signal für H-6 unverändert blieb ( $\delta$  4.07 ppm, 1H, *t*,  $J = 11.0$  Hz), erfuhr das Signal für H-7 eine Verschiebung ins Hochfeld ( $\delta$  2.04 ppm, 1H, *dt*,  $J = 11.0$  und 12.1 Hz) und zeigte einen weiteren Kopplungspartner. Dieser fand sich in dem Signal bei  $\delta$  2.64 ppm (1H, *m*) welches mit Hilfe eines H-H-COSY-Spektrums dem Proton an C-11 zugeordnet wurde, das seinerseits Korrelationen zur Methylgruppe (H-13) zeigte. Damit ergab sich die Struktur eines Elemanolidlaktons, das keine Doppelbindung zwischen C-11 und C-13 aufwies. Dieses Sesquiterpenlaktone trägt den Trivialnamen 11 $\beta$ ,13-Dihydrovernodalin (Abb. 2.25). Der Vergleich mit Literaturdaten (Ganjian et al., 1983) bestätigte die Vermutung, dass Verbindung **39** mit diesem Naturstoff identisch war.

### Strukturaufklärung von 11 $\beta$ ,13-Dihydrovernodolid (**40**)

Die Molmasse von **40** war nicht aus dem EI-Massenspektrum ersichtlich. Vielmehr trat ein Fragment bei  $m/z$  279 auf, welches nachträglich dem Sesquiterpengrundkörper  $[M - C_4H_5O_2]^+$  nach Esterspaltung zugeordnet wurde. Die Acylkomponente wurde durch das

Fragment bei  $m/z$  69  $[\text{CO-C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2]^+$  als Methacrylsäure identifiziert.

Die Methacrylsäure wurde im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum durch die folgenden Signale charakterisiert: ein Singulett bei  $\delta$  1.97 ppm (3H, C-19) und je ein breites Singulett bei  $\delta$  5.69 und 6.16 ppm (je 1H, H-18a bzw. H-18b). Desweiteren waren Strukturähnlichkeiten mit der Laktonpartialstruktur (C-6, C-12) von **39** zu erkennen. Es waren keine weiteren Exomethylengruppen im Molekül vorhanden, auch die Vinylgruppe fehlte. Dafür war das Signal eines olefinischen Protons bei  $\delta$  5.50 ppm (1H, *brd*,  $J = 10.0$  Hz) zu erkennen. Aufgrund der Lage der Signale für sechs Protonen ( $\delta$  2.70 - 5.52 ppm) im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, konnte auf eine direkte Nachbarschaft mit einem Sauerstoffatom geschlossen werden. Hochoxydierte Sesquiterpenderivate finden sich häufig in *Vernonia*-Arten. Durch Vergleich der Daten von Jakupovic et al. (1987) schien das Vorliegen eines Germacranolids als wahrscheinlich. Tatsächlich deckten sich die Daten von **40** mit den publizierten Angaben für 11 $\beta$ ,13-Dihydrovernodol aus *Vernonia condensata* BAKER (Jakupovic et al., 1987).

### Strukturaufklärung von 11 $\beta$ ,13,17,18-Tetrahydrovernodol (**41**)

Da die Verbindungen **40** und **41** als nicht zu trennendes Gemisch isoliert wurden, konnte von minimalen strukturellen Unterschieden beider Substanzen ausgegangen werden. Tatsächlich zeigten sich nur wenige Abweichungen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, die sich auf den Acylrest bezogen. So trat bei  $\delta$  1.19 ppm ein Dublett ( $J = 6.9$  Hz) auf, das sechs Protonen und somit zwei Methylgruppen entsprach. Zudem erschien ein Signal bei  $\delta$  2.69 ppm (1H, *m*), welches im H-H-COSY-Spektrum Korrelationen zu den Methylgruppen zeigte. Damit ergab sich die Struktur eines Isobuttersäurerestes. Das Fragment im EI-Massenspektrum bei  $m/z$  71  $[\text{CO-CH}(\text{CH}_3)_2]^+$  bestätigte den Verdacht. Da die restlichen Protonensignale sich kaum von denen von **40** unterschieden, konnte **41** als 11 $\beta$ ,13,17,18-Tetrahydrovernodol (Abb. 2.25) identifiziert werden. Die entsprechenden Literaturdaten findet man bei Toubiana und Gaudemer (1967) und Kupchan et al. (1969).

## 2.2.8 Pharmakologische Untersuchung von *Vernonia colorata*

### *In-vitro*-Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*

Die antiplasmodialen Aktivitäten der Rohextrakte und isolierten Verbindungen aus *V. colorata* sind in Tabelle 2.12 wiedergegeben.

Wie schon bei *A. afro* erwiesen sich der methanolische und der wässrige Extrakt aus den Blättern von *V. colorata* in unserem Testsystem als unwirksam, obgleich nach einer Publikation von Benoit et al. (1996) ein Infus (1:10 Droge/Wasser) aus der pulverisierten Droge nach 24 Stunden Inkubationszeit einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 4.7  $\mu\text{g/ml}$  und nach 72 Stunden einen Wert von 2.35  $\mu\text{g/ml}$  gegen *P. falciparum* aufwies (FcB1, Chloroquin-resistenter Stamm:  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0.20  $\mu\text{g/ml}$  [Chloroquin]). Selbst der lipophile Rohextrakt mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von 12.1 (PoW) und 17.8  $\mu\text{g/ml}$  (Dd2) war im Vergleich dazu schwächer wirksam.

Vernodalol (**38**) und 11 $\beta$ ,13-Dihydrovernodalin (**39**) konnten als aktivste Verbindungen ( $\text{IC}_{50}$ -Werte: 4.0 und 2.3  $\mu\text{g/ml}$  [PoW], 4.8 und 1.1  $\mu\text{g/ml}$  [Dd2]) für die *in-vitro*-Aktivität des Rohextrakts verantwortlich gemacht werden.

Das Gemisch der Vernolidderivate **40** und **41** zeigte keine Aktivität und auch für die Einzelkomponenten ist somit keine ausgeprägte Wachstumshemmung zu erwarten.

**Tabelle 2.12:** *In-vitro*-Aktivität von Extrakten und isolierten Naturstoffen aus dem Kraut von *Vernonia colorata* gegen *Plasmodium falciparum*.

Extrakt/isolierter Naturstoff	IC <sub>50</sub> -Werte <sup>a</sup>			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
<i>Extrakte</i>				
Lipophiler Extrakt	12.1	-	17.8	-
Hydrophiler Extrakt	> 50	-	> 50	-
Wässriger Extrakt	> 100	-	> 100	-
<i>Sesquiterpenlaktone</i>				
Vernodalol ( <b>38</b> )	<b>4.0</b>	<b>10.2</b>	<b>4.8</b>	<b>12.2</b>
11β,13-Dihydrovernodalol ( <b>39</b> )	<b>2.3</b>	<b>6.4</b>	<b>1.1</b>	<b>3.0</b>
11β,13-Dihydrovernolid ( <b>40</b> ) <sup>b</sup>	> 50	> 143	37.3	107.0
11β,13,17,18-Tetrahydrovernolid ( <b>41</b> ) <sup>b</sup>				
<i>Kontrolle</i>				
Artemisinin	0.0008	0.003	0.004	0.015
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.008	0.015	0.073	0.14

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten

<sup>b</sup> als Gemisch getestet

### *In-vitro*-Aktivität gegen ECV-304-Zellen

Da die zytotoxischen Effekte von Vernodalol und Vernolid gegenüber humanen KB-Zellen bekannt sind (Kupchan et al., 1969) und auch Vernodalol (**38**) und 11β,13-Dihydrovernodalol (**39**) gegenüber der Zelllinie ECV-304 eine Zytotoxizität aufwiesen (IC<sub>50</sub>-Werte: 1.3 µg/ml / 3.3 µM und 1.4 µg/ml / 3.9 µM) kann man in Bezug auf den Wirkmechanismus von einer allgemeinen Zytotoxizität ausgehen.

### 2.2.9 Phytochemische Untersuchung von *Stereospermum kunthianum*

Die Familie der Bignoniaceae, im Englischen wegen der Form ihrer Blüten auch als „Trumpet Creeper“ (Trompeten-Lianen) bezeichnet, umfasst etwa 100 Gattungen mit 800 Arten. Es sind überwiegend tropische Bäume oder Sträucher mit auffälligen Blüten. Ein berühmter Vertreter dieser Familie ist *Kigelia africana* (LAMARCK) BENTHAM (syn. *K. pinnata* (JACQUIN) D.C.), ein 15 m hoher Baum, der aufgrund seiner 60 cm langen, wurstähnlichen, grauen Früchte im Volksmund als „Leberwurstbaum“ bezeichnet wird. Verschiedene antimikrobielle Untersuchungen der Wurzeln und Früchte zeigten, dass die isolierten Naphthochinone und Kaffesäurederivate eine moderate antibakterielle und antimykotische Wirkung aufweisen (Binutu et al., 1996). Desweiteren findet man in der Literatur Untersuchungen zur antiparasitären Aktivität, für die die aus den jeweiligen Pflanzenteilen isolierten Naphthochinone verantwortlich sind (Moideen et al., 1999; Weiss et al., 2000).

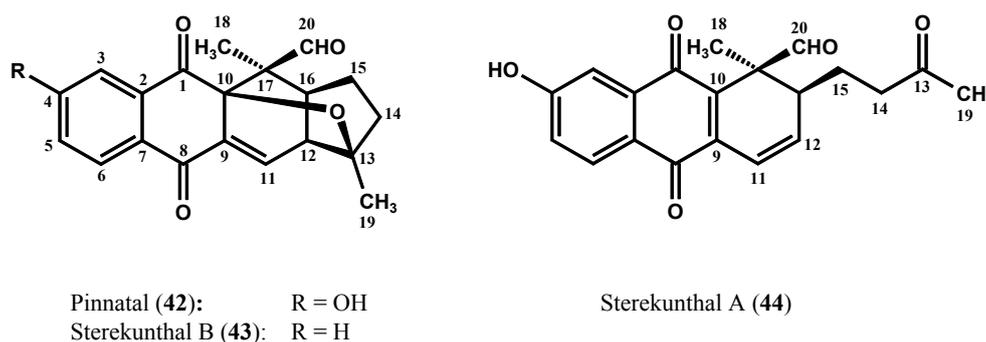


**Abbildung 2.26:** *Stereospermum kunthianum* CHAM., Bignoniaceae.

Bei *Stereospermum kunthianum* CHAM. (Abb. 2.26) handelt es sich um einen bis zu zehn Meter hohen Baum, der in den Savannenlandschaften Afrikas vom Senegal bis Südafrika bis in eine Höhe von 2000 m zu finden ist. In der Trockenzeit zeigt der ansonsten fast laubfreie Baum seine violetten Blüten. Die verwachsenen Blütenblätter werden bis zu 5 cm lang, die gefiederten Laubblätter stehen zu 3-4 Paaren zusammen. In der Sahel-Zone etwa, ist der volkstümliche Name „Ngolobi“ (Sprache: Fulfuldé) für *S. kunthianum* gebräuchlich. Die Wurzelrinde dieser Pflanze wird von einigen Volksgruppen Ugandas als Fiebermittel eingesetzt und ein Infus aus den Blättern wird zum Auswaschen von Wunden genutzt (Eggeling, 1951; Petit, 2002).

### 2.2.9.1 Strukturaufklärung der Naphthochinone 42-44

Der lipophile Extrakt aus der Wurzelrinde von *S. kunthianum* zeigte im Screeningversuch (Kap. 2.1.3) eine gute Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten von 7.0 (PoW) und 16.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Dd2). Die anschließende Fraktionierung (Kap. 5.8.1) führte zur Isolierung von drei Naphthochinonen. Die Strukturen wurden anhand spektroskopischer Methoden, wie EI-MS-, HR-MS-,  $^1\text{H}$ -NMR-,  $^{13}\text{C}$ -NMR-, H-H-COSY- und HMBC-Messungen aufgeklärt. Im folgenden Abschnitt soll wiederum zunächst auf die Strukturaufklärung dieser Naturstoffe eingegangen werden, bevor die biologischen Aktivitäten beschrieben werden.



**Abbildung 2.27:** Strukturen der aus *Stereospermum kunthianum* isolierten Naphthochinone 42-44.

#### Strukturaufklärung von Pinnatal (42)

Für Verbindung **42** ergab sich eine Molmasse von  $m/z$  338, welche mit der Summenformel  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$  korrelierte. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.13) zeigte das Kopplungsmuster eines 1,2,4-trisubstituierten Aromaten ( $\delta$  7.28 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2.5, 8.5$  Hz, H-5,  $\delta$  7.54 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.5$  Hz, H-3,  $\delta$  8.22 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.5$  Hz, H-6), die Signale für ein olefinisches Proton ( $\delta$  7.83 ppm, 1H, *d*,  $J = 7$  Hz, H-11) sowie für eine Aldehydfunktion ( $\delta$  10.26 ppm, 1H, *s*, H-20). Zusätzlich waren zwei Methylgruppen ( $\delta$  0.70 ppm, 3H, *s*, H-18,  $\delta$  1.18 ppm, 3H, *s*, H-19), die keine Kopplungen zu benachbarten Protonen aufwiesen, zu erkennen. Sechs weitere Signale befanden sich im Bereich von  $\delta$  1.73 - 2.94 ppm.

Da die  $^1\text{H}$ -NMR-Daten denen von Pinnatal sowie dem 5-Hydroxyisomer Isopinnatal sehr ähnlich waren, konnte es sich bei **42** nur um einen der beiden Naturstoffe handeln. Beide Naphthochinone konnten bereits zuvor aus *K. pinnata* isoliert werden (Joshi et al., 1982; Akunyili und Houghton, 1993). Die  $^1\text{H}$ -NMR-Daten allein reichten allerdings nicht aus, die endgültige Position (C-4 oder C-5) der Hydroxygruppe zu klären. Daher wurde zusätzlich ein HMBC-Spektrum (Tab. 2.13) aufgenommen. Das Proton der Doppelbindung bei  $\delta$  7.83 ppm und das *ortho*-koppelnde aromatische Proton bei  $\delta$  8.22 ppm zeigten hierbei eine Korrelation zu demselben Carbonylsignal bei  $\delta$  177.9 ppm (C-8). Die phenolische Hydroxygruppe mußte sich also am C-4 befinden, so dass es sich bei Verbindung **42** um Pinnatal (Abb. 2.27) handelte.

### Strukturaufklärung von Sterekunthal B (**43**)

Das EI-Massenspektrum von Verbindung **43** zeigte einen Moleküllionpeak von  $m/z$  322. Mit Hilfe der HR-Massenspektrometrie ergab sich die zugehörige Summenformel  $C_{20}H_{18}O_4$ . Im Vergleich zu Pinnatal (**42**) besaß **43** somit ein Sauerstoffatom weniger. Unterschiede im  $^1H$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.13) zeigten sich im aromatischen Bereich. Die Signale bei  $\delta$  8.15 und 8.28 ppm bildeten jeweils Doppeldoublets aus. Die Kopplungskonstanten ( $J = 1.0$  bzw. 1.5 und 8.0 Hz) gaben Hinweise auf eine *meta*- und eine *ortho*-Kopplung.

**Tabelle 2.13:**  $^1H$ -NMR-Daten [400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)] von Pinnatal (**42**) und Sterekunthal B (**43**), sowie  $^{13}C$ -NMR-Daten [100 MHz,  $AcetonD_6$ ,  $\delta$  (ppm)] und HMBC-Korrelationen von Pinnatal (**42**).

Position	<b>42</b>	$\delta_C$	HMBC-Korrelationen	<b>43</b>
	$\delta_H^a$			$\delta_H^a$
1		194.1		
2		138.2		
3	7.54 (1H, <i>d</i> , 2.5)	113.2	1,5,7	8.15 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.5) <sup>b</sup>
4		164.0		7.76 (1H, <i>td</i> , 8.0, 1.5) <sup>c</sup>
5	7.28 (1H, <i>dd</i> , 2.5, 8.5)	124.0	7	7.82 (1H, <i>td</i> , 1.0, 8.0) <sup>c</sup>
6	8.22 (1H, <i>d</i> , 8.5)	131.3	2,4,8	8.28 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 8.0) <sup>b</sup>
7		128.6		
8		178.0		
9		140.8		
10		79.2		
11	7.83 (1H, <i>d</i> , 7.0)	142.6	8,10,12,13,16	7.88 (1H, <i>d</i> , 7.0)
12	2.94 (1H, <i>dd</i> , 4.0, 7.0)	50.8	9,11,17	2.96 (1H, <i>dd</i> , 4.0, 7.0)
13		85.5		
14	1.73 (1H, <i>m</i> )	38.3	15	1.77 (1H, <i>dd</i> , 2.0, 11.0)
	1.84-2.04 (1H, <i>m</i> )			1.85-2.05 (1H, <i>m</i> )
15	1.84-2.04 (1H, <i>m</i> )	26.4	12,13	1.85-2.05 (1H, <i>m</i> )
	2.26			2.28
	(1H, <i>ddd</i> , 6.0, 8.0, 14.0)			(1H, <i>ddd</i> , 6.0, 8.0, 14.0)
16	1.84-2.04 (1H, <i>m</i> )	47.6	14,17	1.85-2.05 (1H, <i>m</i> )
17		57.0		
18	0.70 (3H, <i>s</i> )	19.1	10,16,17	0.68 (3H, <i>s</i> )
19	1.18 (3H, <i>s</i> )	24.5	12,13,14	1.19 (3H, <i>s</i> )
20	10.26 (1H, <i>s</i> )	206.0	17	10.27 (1H, <i>s</i> )

<sup>a</sup> Intensitäten, Kopplungsmuster und  $J$ -Werte (Hz) in Klammern

<sup>b</sup> Werte austauschbar

<sup>c</sup> Werte austauschbar

Die anderen beiden Signale bei  $\delta$  7.76 und 7.82 ppm zeigten sich als Triplet eines Dubletts, dies deutete auf jeweils drei Kopplungspartner hin. Zwei davon mußten aufgrund der Konstanten jeweils *ortho*-ständig angeordnet sein und ein dritter in *meta*-Stellung. Somit ergab sich die Partialstruktur eines 1,2-disubstituierten Aromaten. Die übrigen Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum waren denen von **42** sehr ähnlich. Demzufolge stellte Verbindung **43** das 4-Desoxyderivat von Pinnatal (**42**) dar. Es handelte sich hierbei um einen neuen Naturstoff, für den der Name Sterekunthal B (Abb. 2.27) vorgeschlagen wurde.

### Strukturaufklärung von Sterekunthal A (**44**)

Verbindung **44** zeigte im EI-MS-Spektrum ebenfalls einen Molekülionpeak bei  $m/z$  338 und besaß somit die gleiche Summenformel wie **42** ( $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$ ). Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.14) waren ebenfalls Gemeinsamkeiten vorhanden.

**Tabelle 2.14:** NMR-Daten [400 und 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] und HMBC-Korrelationen von Sterekunthal A (**44**).

Position	<b>44</b>		
	$\delta_{\text{H}}^a$	$\delta_{\text{C}}^b$	HMBC-Korrelationen
1		185	
2		135	
3	7.49 (1H, <i>d</i> , 2.5)	113	1,5,7
4		163	
5	7.16 (1H, <i>dd</i> , 2.5, 8.5)	122	3,7
6	7.99 (1H, <i>d</i> , 8.5)	130	2,4,8
7		125	
8		182	
9		139	
10		140	
11	6.95 (1H, <i>d</i> , 9.5)	120	8,10,16
12	6.44 (1H, <i>dd</i> , 6.0, 9.5)	138	9,16,17
13		208	
14	2.49 (1H, <i>m</i> )	42	13,16
15	1.85 (1H, <i>m</i> )	24	12,14
16	2.49 (1H, <i>m</i> )	44	10,11,12,18
17		49	
18	1.29 (3H, <i>s</i> )	18	10,16,17,20
19	2.13 (3H, <i>s</i> )	31	13,14
20	9.95 (1H, <i>s</i> )	204	17,18

<sup>a</sup> Intensitäten, Kopplungsmuster und *J*-Werte (Hz) in Klammern

<sup>b</sup> Daten aus HMBC-Spektrum abgeleitet

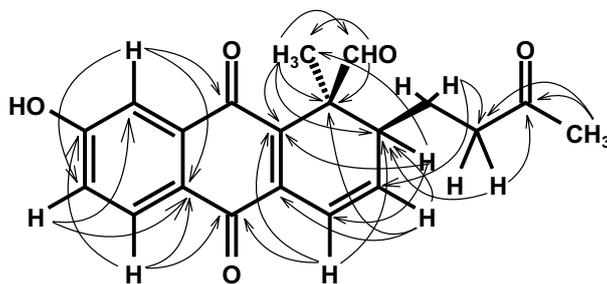


Abbildung 2.28: HMBC-Korrelationen von Sterekunthal A (44).

So waren die Signale für die Aldehydgruppe ( $\delta$  9.95 ppm, 1H, *s*) und den 1,2,4-trisubstituierten Aromaten ( $\delta$  7.16 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2.5, 8.5$  Hz, H-5,  $\delta$  7.49 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.5$  Hz, H-3,  $\delta$  7.99 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.5$  Hz, H-6) erkennbar. Darüber hinaus wies das Spektrum zwei olefinische Signale bei  $\delta$  6.95 (1H, *d*,  $J = 9.5$  Hz) und 6.44 ppm (1H, *dd*,  $J = 6.0, 9.5$  Hz) auf, was auf eine *cis*-konfigurierte Doppelbindung mit einem benachbarten Proton schließen ließ. Auch zeigten sich die Signale für zwei Methylgruppen ( $\delta$  1.29 und 2.13 ppm, je 3H, *s*), die aber im Vergleich zu **42** ins Tieffeld verschoben waren. Die Lage des zweiten Singulets deutete auf eine Methylketon-Partialstruktur hin. Diese Vermutung wurde sowohl durch das Signal bei  $\delta$  208 ppm im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.14) als auch durch HMBC-Korrelationen (Abb. 2.28, Tab. 2.14) des Methylsignals zur Carbonyl- und einer Methylengruppe ( $\delta$  2.49 ppm, 2H, *m*) bestätigt. Benachbart dazu lag eine zweite Methylengruppe ( $\delta$  1.85 ppm, 2H, *m*). Dieses Methylketonelement war aufgrund bestehender Korrelationen im HMBC-Spektrum an Position 16 ( $^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  2.49 ppm, 1H, *m*,  $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  44 ppm) mit dem restlichen Molekül, das strukturell dem Pinnatal (**42**) glich, verbunden.

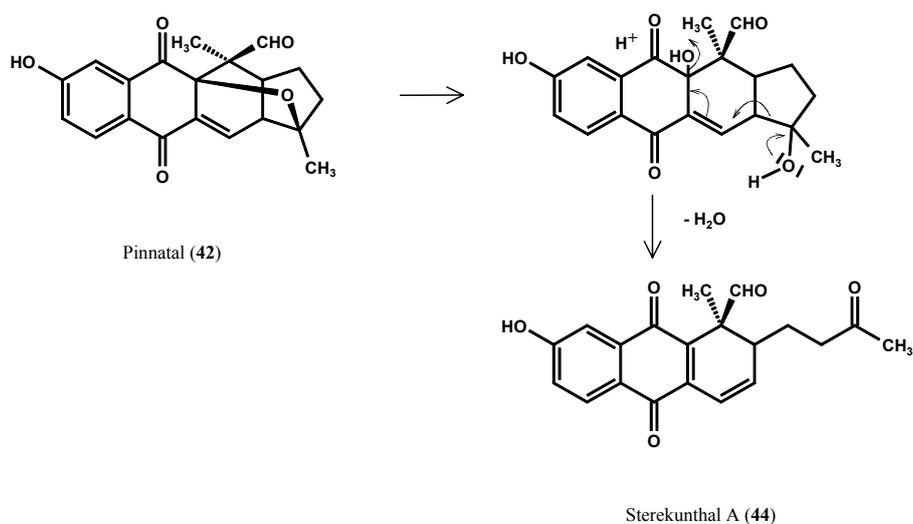


Abbildung 2.29: Mögliche strukturelle Beziehung zwischen Pinnatal (42) und Sterekunthal A (44).

Ausgehend von **42** mußte zum einen die Etherbrücke gespalten und zum anderen unter Wasseraustritt eine neue Doppelbindungen im Molekül eingefügt worden sein. Dabei wurde der Cyclopentanring geöffnet (Abb. 2.29).

Somit ergab sich die Struktur von Sterekunthal A (**44**, Abb. 2.27), einem neuen Naturstoff.

## 2.2.10 Pharmakologische Untersuchung von *Stereospermum kunthianum*

### *In-vitro*-Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*

Die antiplasmodialen Aktivitäten der Rohextrakte und isolierten Verbindungen aus *S. kunthianum* sind in Tabelle 2.15 wiedergegeben.

Der methanolische Extrakt aus der Wurzelrinde von *S. kunthianum* zeigte, wie schon in Kapitel 2.1.3 beschrieben, keine Aktivität. Der lipophile Extrakt hingegen wies Aktivitäten von 7.0 µg/ml gegen PoW und 16.8 µg/ml gegen Dd2 (IC<sub>50</sub>-Werte) auf.

Von den isolierten Naphthochinonen zeigte Sterekunthal A (**44**) eine sehr gute Aktivität, insbesondere gegen den Chloroquin-resistenten Klon Dd2 (IC<sub>50</sub>-Werte: 1.3 µg/ml [PoW], 0.4 µg/ml [Dd2]). Auch Pinnatal (**42**) hatte eine, im Vergleich zum Rohextrakt, gesteigerte Aktivität. Beiden Verbindungen gemein ist die Hydroxygruppe in Position 4. Diese scheint bei der Wirkung eine Rolle zu spielen, denn Sterekunthal B (**43**) erwies sich als deutlich schwächer wirksam (IC<sub>50</sub>-Werte: 19.3 µg/ml [PoW], 15.3 µg/ml [Dd2]).

**Tabelle 2.15:** *In-vitro*-Aktivität von Extrakten und isolierten Naphthochinonen aus der Wurzelrinde von *Stereospermum kunthianum* gegen *Plasmodium falciparum*.

Extrakt/isolierter Naturstoff	IC <sub>50</sub> -Werte <sup>a</sup>			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
<i>Extrakte</i>				
Lipophiler Extrakt	7.0	-	16.8	-
Hydrophiler Extrakt	> 50	-	> 50	-
<i>Naphthochinone</i>				
Pinnatal ( <b>42</b> )	<b>5.6</b>	<b>16.6</b>	<b>7.4</b>	<b>21.9</b>
Sterekunthal B ( <b>43</b> )	19.3	59.9	15.3	47.5
Sterekunthal A ( <b>44</b> )	<b>1.3</b>	<b>3.8</b>	<b>0.4</b>	<b>1.2</b>
<i>Kontrolle</i>				
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.008	0.015	0.073	0.14

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten

***In-vitro*-Aktivität gegen ECV-304-Zellen**

Auf der anderen Seite besitzen insbesondere die Verbindungen **42** und **44** eine deutliche Toxizität gegenüber endothelialen ECV-304-Zellen (Tab. 2.16), so dass ihr antiplasmodialer Effekt zum großen Teil auf einer allgemeinen Zytotoxizität beruhen dürfte. Die Selektivitätsindizes sind dementsprechend niedrig.

**Tabelle 2.16:** *In-vitro*-Aktivität der Naphthochinone, isoliert aus der Wurzelrinde von *Stereospermum kunthianum*, gegen die Zelllinie ECV-304.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Werte <sup>a</sup>			SI <sup>b</sup>
	ECV-304		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	
<i>Naphthochinone</i>				
Pinnatal ( <b>42</b> )	<b>2.2</b>	<b>6.5</b>	7.4	<b>0.30</b>
Sterekunthal B ( <b>43</b> )	16.0	49.7	15.3	1.05
Sterekunthal A ( <b>44</b> )	<b>0.9</b>	<b>2.7</b>	0.4	<b>2.25</b>
<i>Kontrolle</i>				
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	30.0	58.1	0.073	411.0

<sup>a</sup> Anzahl der Experimente: 8 (ECV-304); 3 (Dd2)

<sup>b</sup> Berechnung s. Kap. 5.4.5

## 2.3 Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen TEIL II: Weitere Pflanzenarten

### 2.3.1 Phytochemische Untersuchung von *Bonamia spectabilis*

Bezüglich den bisher isolierten Verbindungen, die eine antiplasmodiale Aktivität zeigten, fiel auf, dass Naturstoffe mit mehreren Methoxygruppen im Molekül eine erhöhte Aktivität verglichen mit ihren unmethylierten Derivaten aufwiesen. Besonders auffällig war dies bei den 4-Phenylcumarinen (Neoflavonoide) aus *Exostema mexicanum* GRAY, Rubiaceae, (Köhler et al., 2001) oder bei den in Kapitel 2.2.6 beschriebenen Flavonen aus *Artemisia afra*. Daher erschien es lohnend, die *in-vitro*-Aktivität anderer polymethoxylierter Verbindungen zu untersuchen.



**Abbildung 2.30:** *Bonamia spectabilis* (CHOISY) HALL. F., Convolvulaceae.

*Bonamia spectabilis* (CHOISY) HALL. F., Convolvulaceae, ist ein kleiner Kletterstrauch, der auf Madagaskar und im tropischen Ostafrika vorkommt. Bei der Aufzucht im institutseigenen Gewächshaus fiel die relative Unempfindlichkeit dieser Pflanze gegenüber Schadinsekten auf. Es war zu vermuten, dass biologisch aktive Naturstoffe für diesen Effekt verantwortlich sind. In einer ersten Untersuchung der oberirdischen Pflanzenteile (im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Britta Tofern) konnten das Hexamethoxylignan **47** sowie mehrere Sesquilignane vom Tetrahydrofuran Typ (Bonaspectine **48** - **50** und **52**) und Sesquieolignane vom 8.O.4'-Typ (Neobonaspectine **57** und **58**) isoliert und charakterisiert werden (Tofern, 1999). Alle diese Lignanoide wiesen einen hohen Methoxylierungsgrad auf.

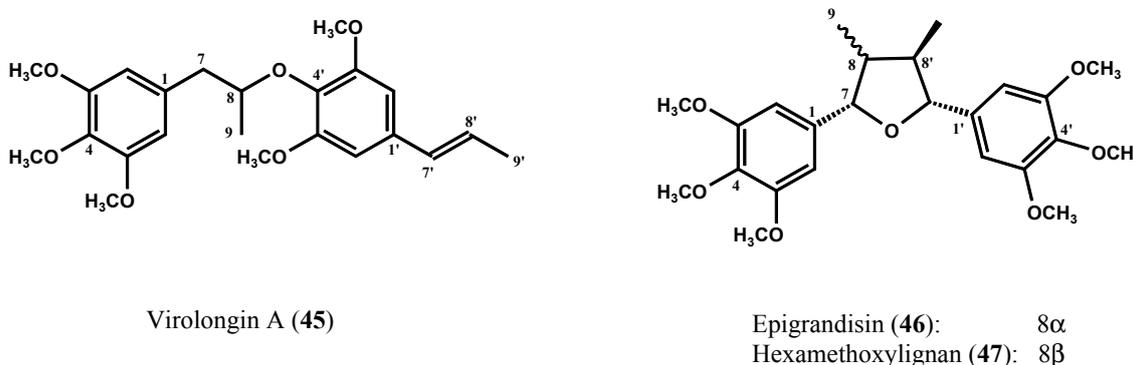
In einer Arbeit von Bastos et al. (1999) konnte für einige Lignane eine antitrypanosomale Aktivität (*Trypanosoma cruzi*) nachgewiesen werden, so dass im Rahmen dieser Arbeit auch die in *B. spectabilis* enthaltenen Lignanderivate auf ihre antiplasmodiale Aktivität untersucht werden sollten.

Die erneute phytochemische Bearbeitung der ober- und unterirdischen Pflanzenteile führte neben den schon bekannten Verbindungen zur Isolierung weiterer sechs Lignanoide, darunter ein Neolignan, ein Lignan und vier Sesquilignane vom Tetrahydrofuran Typ. Im

folgenden Abschnitt soll vor allem auf die Strukturaufklärung derjenigen Naturstoffe eingegangen werden, die zum ersten Mal aus *B. spectabilis* isoliert wurden; auf schon bekannte Verbindungen wird nur kurz eingegangen. Die biologischen Aktivitäten der einzelnen Verbindungen werden nachfolgend behandelt.

### 2.3.1.1 Strukturaufklärung der Lignane/Neolignane 45-47

Aus dem PE-Extrakt der oberirdischen Pflanzenteile sowie der Wurzeln von *B. spectabilis* ließen sich das Neolignan **45** und zwei Lignane (**46** und **47**) isolieren (Kap. 5.9.1.1, 5.9.1.2), wobei **47** schon aus dieser Spezies bekannt war. Die Strukturen wurden anhand von EI-MS-,  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aufgeklärt.



**Abbildung 2.31:** Strukturen der aus *Bonamia spectabilis* isolierten Lignane **45-47** (relative Konfiguration).

### Strukturaufklärung von Virolongin A (**45**)

Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  402, der Basispeak lag bei  $m/z$  209. Anhand der früheren Strukturcharakterisierungen dieser Stoffklasse konnte das Fragment einer Phenylpropaneinheit mit drei Methoxygruppen am Aromaten zugeordnet werden.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte zwei Methyl-Signale bei  $\delta$  1.22 ppm (3H, *d*,  $J = 6.2$  Hz) und 1.88 ppm (3H, *dd*,  $J = 1.5$  und 6.5 Hz). Das zweite Signal war ins Tieffeld verschoben und zeigte Kopplungen zu zwei Protonen. Die Kopplungspartner fanden sich in den Signalen für eine *trans*-Doppelbindung ( $\delta$  6.15 ppm, 1H, *dd*,  $J = 6.5$  und 15.6 Hz,  $\delta$  6.33 ppm, 1H, *dd*,  $J = 1.5$  und 15.6 Hz). Ausgehend von der Vermutung, dass es sich bei **45** tatsächlich um ein Lignanoid handelte, wurde das Signal bei  $\delta$  1.88 ppm einer endständigen Methylgruppe (H-9'), das Signal bei  $\delta$  6.15 ppm dem benachbarten olefinischen Proton an C-8' und das Signal bei  $\delta$  6.33 ppm dem H-7' zugeordnet. Die Protonen des aromatischen Phenylanteils ergaben ein Singulett bei  $\delta$  6.55 ppm (2H, *s*, H-2'/6').

Der zweite Phenylpropananteil war durch eine Methylengruppe ( $\delta$  2.73 ppm, 1H, *dd*,  $J = 7.8$  und 14.0 Hz,  $\delta$  3.11 ppm, 1H, *dd*,  $J = 5.3$  und 14.0 Hz) charakterisiert. Das Multiplett bei  $\delta$  4.39 ppm stellte das Proton einer Methingruppe dar, das zum einen mit der Methylengruppe und zum anderen mit der zweiten Methylgruppe ( $\delta$  1.22 ppm) koppelte. Die chemische Verschiebung zeigte die Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom an. Die

Protonen des Aromaten ergaben ebenfalls ein Singulett bei  $\delta$  6.45 ppm (2H, *s*, H-2'/6'). Aufgrund dieser Tatsache konnte von einer symmetrischen Anordnung der insgesamt fünf Methoxygruppen ausgegangen werden ( $\delta$  3.81 bis 3.84 ppm, 15 H, *s*). Ebenso mußten die beiden Phenylpropaneinheiten über eine Etherbrücke zwischen C-8 und C-4' verknüpft sein, da bei einer unsymmetrischen Verknüpfung die aromatischen Protonensignale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum unterschiedliche chemische Verschiebungen aufgewiesen hätten. Verbindung **45** konnte somit einem Neolignan vom 8.O.4'-Typ zugeordnet werden.

Die Struktur dieses Neolignans ist unter dem Trivialnamen Virolongin A (Abb. 2.31) bekannt, welches erstmals aus der Myristicaceae *Virola elongata* WARB. isoliert wurde (MacRae und Towers, 1985).

### Strukturaufklärung von Epigrandisin (46)

Das EI-Massenspektrum von **46** zeigte einen deutlichen Peak bei  $m/z$  432, der später der Summenformel  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$  zugeordnet werden konnte.

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erschienen erneut zwei Singuletts bei  $\delta$  6.56 und 6.74 ppm für je zwei aromatische Protonen und laut der Integrale der Signale im Bereich von  $\delta$  3.83-3.88 ppm waren sechs Methoxygruppen im Molekül vorhanden. Hinzu kamen die Signale zweier Methylgruppen ( $\delta$  0.70 ppm, 3H, *d*,  $J = 7.0$  Hz,  $\delta$  1.12 ppm, 3H, *d*,  $J = 6.5$  Hz), die je ein Nachbarproton besaßen. Wie auch schon bei **45** beobachtet, waren die benachbarten Protonen durch Multipletts im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum charakterisiert ( $\delta$  1.80 ppm, 1H, *m*,  $\delta$  2.26 ppm, 1H, *m*). Die restlichen zwei Signale zeigten durch ihre Lage ( $\delta$  4.43 und 5.11 ppm, je 1H, *d*) im Spektrum die Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom an. So ergab sich die Struktur eines Lignans vom Tetrahydrofuran-Typ. Zum Schluß stellte sich die Frage nach der Konfiguration der Protonen in diesem Heterozyklus. In einer Arbeit von Sarkanen und Wallis (1973) wurden die  $^1\text{H}$ -NMR-Daten für Tetrahydrofurane, die mit je zwei Methyl- und Arylgruppen substituiert waren, bezüglich der Stellung der Substituenten im Ring verglichen. In Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der Signale für die beiden Methingruppen (H-7/7' und H-8/8') sowie der Methylgruppen (H-9/9') konnte somit die relative Konfiguration aufgeklärt werden. Demnach standen je eine Arylgruppe und eine Methylgruppe sowie die beiden Methylgruppen untereinander in *trans*-Stellung zueinander, während die zweite Methylgruppe und die verbleibende Arylgruppe *cis*-ständig zueinander standen.

Es ergab sich also für **46** die Struktur von *rel*-(7S,8R,7'R,8'R)-3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxylignan (Abb. 2.31). Die ermittelten  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten entsprachen den Literaturdaten von Fonseca et al. (1979). Dieser Naturstoff ist unter dem Namen Epigrandisin bekannt und konnte z. B. aus *Aglaia leptantha* MIQ., Meliaceae, isoliert werden (Greger et al., 2000).

### Strukturaufklärung von *rel*-(7S,8S,7'R,8'R)-3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxylignan (47)

Die Verbindung **47** wies im EI-Massenspektrum ebenfalls einen Molekülionpeak von  $m/z$  432 auf.

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erschienen aber deutlich weniger Signale als bei Verbindung **46**. Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei **47** erneut um ein hexamethoxyliertes Li-

gnan vom Tetrahydrofuran-Typ handelte, mußte das Molekül einen symmetrischen Aufbau besitzen. Demnach charakterisierte das Singulett bei  $\delta$  6.67 ppm anstelle von zwei entsprechend vier aromatische Protonen u.s.w. Somit stellte Verbindung **47** ein Stellungsisomer von **46** dar und war folglich *7,8-trans-8,8'-cis-8',7'-trans* konfiguriert. Der Vergleich mit Tofern (1999) bestätigte die Vermutung, dass es sich bei Verbindung **47** um *rel*-(7S,8S,7'R,8'R)-3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxylignan (Abb. 2.31) handelte, das somit erneut aus *B. spectabilis* isoliert werden konnte.

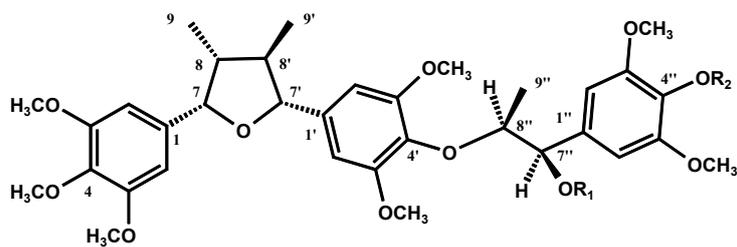
### 2.3.1.2 Strukturaufklärung der Sesquilignane 48-56

Aus dem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakt der oberirdischen Pflanzenteile von *B. spectabilis* wurden insgesamt acht Sesquilignane gewonnen, von denen vier (**48/49**, **50** und **52**) bereits bekannt waren. Die anderen vier Verbindungen (**53/54** und **55/56**) wurden aufgrund ihrer geringen Konzentration als Isomergemische isoliert. Die jeweiligen spektroskopischen Daten konnten durch Vergleich mit den Spektraldaten verwandter Verbindungen jedem Diastereomer zugeordnet werden. Durch saure Hydrolyse wurde Verbindung **51** aus dem entsprechenden Glukosid **50** gewonnen (Kap. 5.9.1.1). Die Strukturen wurden anhand von EI-MS- und HR-MS-Messungen sowie <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR- und H-C-COSY-Spektren aufgeklärt.

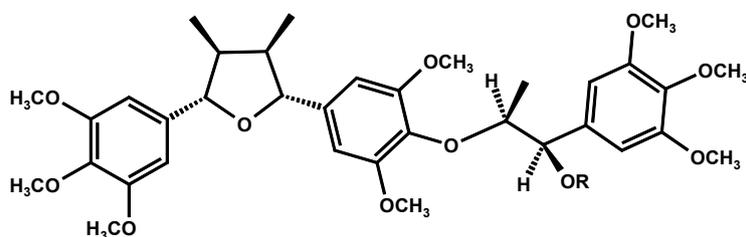
### Strukturaufklärung von Bonaspectin A (48) und Bonaspectin B (49)

Das EI-Massenspektrum zeigte zunächst einen Molekülionpeak bei *m/z* 626, der Basispeak lag, wie bei Virolongin A (**45**), bei *m/z* 209. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass ein Strukturelement dieser Verbindung ein trimethoxylierter Phenylpropankörper war.

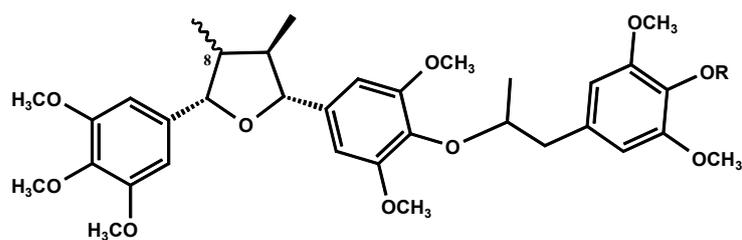
Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum war zu erkennen, dass es sich um zwei Verbindungen (**48** und **49**) handeln mußte. So zeigte das Spektrum sechs Singuletts im aromatischen Bereich, die leicht zueinander verschoben waren. Insgesamt erschienen die Signale für sechs Methylgruppen (je 3H, *d*, bei  $\delta$  1.07, 1.08, 1.23, 0.70, 1.11 und 1.24 ppm), jeweils zwei von ihnen waren nahezu identisch mit den Signalen der Methylgruppen (H-9 und H-9') von **47** ( $\delta$  1.08 ppm, 6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-9/9') und **46** ( $\delta$  0.70 ppm, 3H, *d*, *J* = 7.0 Hz, H-9,  $\delta$  1.12 ppm, 3H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-9'). Beim Vergleich der jeweiligen Protonensignale fiel auf, dass sich beide Moleküle im Lignananteil nur durch die Stellung des Protons in Position 8 unterschieden. Die Konfiguration der Verbindung **48** war identisch mit **47** und wies eine *7,8-trans-8,8'-cis-8',7'-trans*-Konfiguration der Substituenten im Heterozyklus auf ( $\delta$  2.36 ppm, 2H, *m*, H-8/8',  $\delta$  4.52 ppm, 2H, *m*, H-7/7'). Verbindung **49** besaß ein  $\beta$ -ständiges Proton in Position 8 und war somit *cis-trans-trans*-konfiguriert ( $\delta$  1.82 ppm, 1H, *m*, H-8',  $\delta$  2.27 ppm, 1H, *m*, H-8, 4.42, 1H, *m*, H-7',  $\delta$  5.12 ppm, 1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-7). Die restlichen Signale ( $\delta$  1.23 bzw 1.24 ppm, 3H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-9'',  $\delta$  2.75 ppm, je 1H, *m*, H-7''a,  $\delta$  3.12 ppm, je 1H, *m*, H-7''b,  $\delta$  4.39 bzw 4.41 ppm, 1H, *m*, H-8'') für eine dritte Phenylpropaneinheit (C-1'' - C-9'') waren nahezu identisch und vergleichbar mit der linken Molekülhälfte von Virolongin A (**45**). Daraus ergab sich der Strukturtyp eines Lignans vom Tetrahydrofuran-Typ, welches mit einem dritten Phenylpropankörper über eine Etherbrücke zwischen C-4' und C-8'' verbunden war. Der Vergleich mit Tofern et al. (2000) ergab, dass es sich bei **48** und **49** tatsächlich um das Isomerenpaar Bonaspectin A und B (Abb. 2.32) handelte.



Bonaspectin D 4''-β-glucosid (52):  $R_1 = H$ ;  $R_2 = \beta$ -Glukose  
 Bonaspectin E (53):  $R_1 = H$ ;  $R_2 = CH_3$   
 Bonaspectin G (55):  $R_1 = \text{Acetyl}$ ;  $R_2 = CH_3$



Bonaspectin F (54):  $R = H$   
 Bonaspectin H (56):  $R = \text{Acetyl}$



Bonaspectin A (48):  $8 \beta$ ;  $R = CH_3$   
 Bonaspectin B (49):  $8 \alpha$ ;  $R = CH_3$   
 Bonaspectin C 4''-β-glucosid (50):  $8 \alpha$ ;  $R = \beta$ -Glukose  
 Bonaspectin C (51):  $8 \alpha$ ;  $R = H$

**Abbildung 2.32:** Strukturen der aus *Bonamia spectabilis* isolierten Sesquilignane 48-56 (relative Konfiguration).

### Strukturaufklärung von Bonaspectin C-4''- $\beta$ -glukosid (**50**)

Das EI-Massenspektrum zeigte einen deutlichen Peak bei  $m/z$  612. Der Basispeak lag diesmal bei  $m/z$  195. Daher war anzunehmen, dass sich Verbindung **50** von den Bonaspectinen A und B (**48** und **49**) in der Anzahl der Methylgruppen unterschied.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wich im Vergleich zu den Daten von **49** tatsächlich nur in wenigen Punkten ab. So waren zusätzlich die Signale für einen Glukoserest ( $\delta$  3.38 ppm, 1H, *m*, H-5'',  $\delta$  3.59 ppm, 1H, *m*, H-3'',  $\delta$  3.64 ppm, 1H, *m*, H-4'',  $\delta$  3.68 ppm, 1H, *t*,  $J = 8.5$  Hz, H-2'',  $\delta$  3.75-3.95 ppm, 2H, *m*, H-6''a/6''b,  $\delta$  4.53 ppm, 1H, *d*,  $J = 7.6$  Hz, H-1'') erkennbar, sowie die Signale für sieben anstatt acht Methoxygruppen. Das EI-MS-Spektrum gab also nur die Masse des Aglykons an, tatsächlich lag aber ein Glukosid vor. Eine FAB-MS-Messung wurde nicht durchgeführt, da sich die Daten von **50** mit denen von Bonaspectin C-4''- $\beta$ -glukosid deckten (Tofern et al., 2000) und Verbindung **50** damit eindeutig identifizierbar war (Abb. 2.32).

### Strukturaufklärung von Bonaspectin C (**51**)

Da schon in den früheren Arbeiten (Tofern, 1999) zu *B. spectabilis* eine Verbindung auftrat (in der Dissertation als Bande **B4** bezeichnet), die im EI-MS-Spektrum einen Molekülion-peak bei  $m/z$  216 und einen Basispeak bei  $m/z$  195 zeigte (Tofern, 1999), wurde durch saure Hydrolyse von **50** Verbindung **51** gewonnen, um die Daten anschließend direkt zu vergleichen.

Tatsächlich zeigte das EI-Massenspektrum die erwarteten Fragmente bei  $m/z$  216 und 195. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum unterschied sich **51** von der Ausgangsverbindung **50** wie folgt. Die Signale für die dritte Phenylpropaneinheit waren mit Ausnahme des Doppeldoublets von H-7''b ins Tieffeld verschoben ( $\delta$  0.4 - 0.7 ppm). Diese Daten deckten sich allerdings nicht mit denen für **B4** aus der Dissertation (Tofern, 1999).

Bis jetzt konnte also das Aglykon Bonaspectin C (Abb. 2.32) nicht eindeutig in den Pflanzenteilen detektiert werden. Eine mögliche Erklärung wäre eine fast vollständige Glukosidierung in der Pflanze, so dass bei der Aufarbeitung keine Lignanoide mit freien Hydroxygruppen in isolierbarer Menge vorliegen.

### Strukturaufklärung von Bonaspectin D-4''- $\beta$ -glukosid (**52**)

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **52** deutete ebenfalls auf eine glukosidische Verbindung mit sieben Methoxygruppen hin. Während sich die Signale im Tetrahydrofurananteil des Moleküls kaum von denen des Bonaspectin C-4''- $\beta$ -glukosids (**50**) unterschieden, war doch ein anderes Kopplungsmuster für den dritten Molekülanteil zu erkennen. Zudem wies das EI-Massenspektrum einen Peak bei  $m/z$  628 auf, so dass vermutlich ein Sauerstoffatom mehr im Aglykon vorhanden war.

Anstelle der Methylengruppe an Position 7'' trat ein Signal bei  $\delta$  4.79 ppm (1H, *d*,  $J = 2.5$  Hz) für das Proton einer mit Sauerstoff substituierten Methingruppe auf. Anhand eines Datenvergleichs (Tofern et al., 2000) wurde Verbindung **52** als Bonaspectin D-4''- $\beta$ -glukosid (Abb. 2.32) identifiziert.

## Strukturaufklärung von Bonaspectin E (53) und Bonaspectin F (54)

Das EI-MS-Spektrum von **53/54** zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  642, das HR-MS-Spektrum ergab die Summenformel  $C_{35}H_{46}O_{11}$ .

Im  $^1H$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.17) zeigten beide Verbindungen die charakteristischen Signale der Bonaspectine. So sah man sechs Singulets für je zwei aromatische Protonen bei  $\delta$  6.53, 6.58 und 6.80 ppm (**53**) sowie bei  $\delta$  6.68, 6.72 und 6.54 ppm (**53**). Hinzu kamen Signale für die Methoxygruppen im Bereich von  $\delta$  3.82 - 3.91 ppm (2x24H, *s*).

Der Verbindung **53** wurden die zwei Methyldoublets bei  $\delta$  0.72 (3H,  $J = 6.9$  Hz, H-9) und 1.15 ppm (3H,  $J = 6.4$  Hz, H-9'), sowie die Doublets bei  $\delta$  5.13 (1H,  $J = 8.5$  Hz, H-7) und 4.44 ppm (1H,  $J = 9.1$  Hz, H-7') zugeordnet. Zusammen mit den Multipletts bei  $\delta$  2.29 und 1.84 ppm (je 1H, H-8, H-8') waren die charakteristischen Signale eines Tetrahydrofuranrings zu erkennen. Die relative Stereochemie des Tetrahydrofuranrings konnte, wie schon erwähnt, durch Vergleich der Daten mit denen von Sarkanen und Wallis (1973) bestimmt werden. Die chemischen Verschiebungen der Protonen von **53** waren typisch für eine *cis*-Konfiguration eines Aryl- und Methyl-Substituenten (Position 7/8) sowie für eine *trans*-Konfiguration des anderen Aryl- und Methyl-Restes an C-7' und C-8'. Die beiden Methylgruppen (H-9, H-9') waren ebenfalls *trans*-ständig, so dass dieselbe Stereochemie wie bei Bonaspectin B (**49**) vorlag.

**Tabelle 2.17:**  $^1H$ -NMR-Daten [400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)] der Bonaspectine E-H (**53-56**).

Proton	$\delta_H^a$			
	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>56</b>
2/6	6.58 (2H, <i>s</i> )	6.68 (2H, <i>s</i> )	6.56 (2H, <i>s</i> )	6.67 (2H, <i>s</i> )
7	5.13 (1H, <i>d</i> , 8.5)	4.53 (1H, <i>d</i> , 6.3)	5.11 (1H, <i>d</i> , 8.6)	4.52 (1H, <i>d</i> , 6.1)
8	2.29 (1H, <i>m</i> )	2.39 (1H, <i>m</i> )	2.27 (1H, <i>m</i> )	2.36 (1H, <i>m</i> )
9	0.72 (3H, <i>d</i> , 6.9)	1.09 (3H, <i>d</i> , 6.5)	0.70 (3H, <i>d</i> , 7.0)	1.07 (3H, <i>d</i> , 6.4)
2'/6'	6.80 (2H, <i>s</i> )	6.72 (2H, <i>s</i> )	6.73 (2H, <i>s</i> )	6.65 (2H, <i>s</i> )
7'	4.44 (1H, <i>d</i> , 9.1)	4.53 (1H, <i>d</i> , 6.3)	4.42 (1H, <i>d</i> , 9.0)	4.51 (1H, <i>d</i> , 6.2)
8'	1.84 (1H, <i>m</i> )	2.39 (1H, <i>m</i> )	1.82 (1H, <i>m</i> )	2.36 (1H, <i>m</i> )
9'	1.15 (3H, <i>d</i> , 6.4)	1.09 (3H, <i>d</i> , 6.5)	1.11 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.08 (3H, <i>d</i> , 6.4)
2''/6''	6.53 (2H, <i>s</i> ) <sup>b</sup>	6.54 (2H, <i>s</i> ) <sup>b</sup>	6.53 (2H, <i>s</i> ) <sup>b</sup>	6.52 (2H, <i>s</i> ) <sup>b</sup>
7''	4.77 (1H, <i>d</i> , 2.6) <sup>b</sup>	4.79 (1H, <i>d</i> , 2.6) <sup>b</sup>	5.85 (1H, <i>d</i> , 3.3) <sup>b</sup>	5.84 (1H, <i>d</i> , 3.4) <sup>b</sup>
8''	4.36 (1H, <i>dq</i> , 2.6, 6.5) <sup>b</sup>	4.34 (1H, <i>dq</i> , 2.6, 6.5) <sup>b</sup>	4.42 (1H, <i>m</i> ) <sup>b</sup>	4.46 (1H, <i>m</i> ) <sup>b</sup>
9''	1.14 (3H, <i>d</i> , 6.5)	1.14 (3H, <i>d</i> , 6.5)	1.31 (3H, <i>d</i> , 6.4) <sup>b</sup>	1.30 (3H, <i>d</i> , 6.4) <sup>b</sup>
OCH <sub>3</sub>	3.82-3.91 (24H, <i>s</i> )	3.82-3.91 (24H, <i>s</i> )	3.78-3.86 (24H, <i>s</i> )	3.78-3.86 (24H, <i>s</i> )
CH <sub>3</sub> CO	-	-	2.20 (3H, <i>s</i> ) <sup>b</sup>	2.19 (3H, <i>s</i> ) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Intensitäten, Kopplungsmuster und  $J$ -Werte (Hz) in Klammern

<sup>b</sup> da **53/54** und **55/56** als Gemische isoliert wurden, ist die Zuordnung der jeweiligen Werte zwischen den beiden Isomeren austauschbar

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der dritten Phenylpropaneinheit entsprachen denen von Bonaspectin D 4''- $\beta$ -glukosid (**52**). Die relative Konfiguration der zwei Methinprotonen H-7'' und H-8'' konnte durch Vergleich mit bekannten Daten bestimmt werden (Tofern et al., 2000). So ergab sich für **53** die Struktur eines Sesquilignans, welches formal das 4''-*O*-Methylderivat von Bonaspectin D (Aglykon) darstellte (Abb. 2.32). Da die Verbindung bisher nicht als Naturstoff beschrieben wurde, wurde entsprechend der Stoffklasse der Name Bonaspectin E vorgeschlagen.

Der Tetrahydrofurananteil von Verbindung **54** war dagegen 7,8-*trans*-8,8'-*cis*-7',8'-*trans* konfiguriert ( $\delta$  1.09 ppm, 6H, *s*,  $\delta$  2.39 ppm, 2H, *m*, H-8/8',  $\delta$  4.53 ppm, 2H, *m*, H-7/7'). Somit stellte **54** das 8-Epimer von Bonaspectin E (**54**) dar, welches Bonaspectin F genannt wurde (Abb. 2.32).

### Strukturaufklärung von Bonaspectin G (**55**) und Bonaspectin H (**56**)

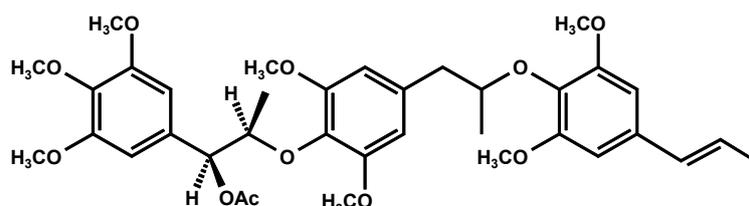
Im EI-Massenspektrum von **55/56** war ein Molekülionpeak bei  $m/z$  684 erkennbar. Das charakteristische Fragment bei  $m/z$  641 deutete auf den Verlust einer Acetylgruppe hin. Hier ergab sich die Summenformel  $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{O}_{12}$  (HR-MS).

Anhand der bekannten chemischen Verschiebungen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Tab. 2.17) für die Signale des Tetrahydrofuranringes, erkannte man eine 7,8-*cis*-8,8'-*trans*-7',8'-*trans*-Konfiguration für Verbindung **55**, während, wie erwartet, Verbindung **56** *trans-cis-trans*-konfiguriert war.

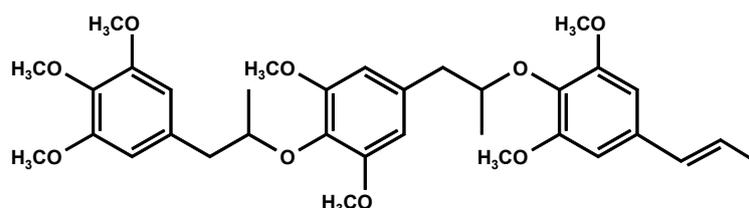
Im dritten Phenylpropananteil des Moleküls verschob sich das Signal für die eine Methin-Gruppe ( $\delta$  5.85 bzw. 5.84 ppm, je 1H, *d*,  $J = 3.3$  bzw. 3.4 Hz, H-7'') ins Tiefeld und wies damit auf eine Veresterung der Hydroxyfunktion hin. Wie schon das EI-Massenspektrum zeigte auch das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum das typische Singulett für jeweils eine Acetylgruppe ( $\delta$  2.20 bzw. 2.19 ppm, je 3H, *s*). Somit stellten **55** und **56** die 7''-*O*-Acetylderivate von **53** und **54** dar (Abb. 2.32). Da diese beiden Naturstoffe ebenfalls bislang noch nicht beschrieben waren, erhielten sie die Namen Bonaspectin G (**55**) und Bonaspectin H (**56**).

### 2.3.1.3 Strukturaufklärung der Sesqueneolignane 57-58

Die Sesqueneolignane Neobonaspectin A und B (**57/58**) wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht erneut aus *B. spectabilis* isoliert. Die Strukturaufklärung beider Verbindungen ist nachzulesen bei Tofern (1999) bzw. Tofern et al. (2000). Da die Substanzen noch im Arbeitskreis vorhanden waren, wurden sie dem antiplasmodialen Test zugeführt und werden in Kapitel 2.3.2 behandelt. In Abbildung 2.33 sind die Strukturen wiedergegeben.



Neobonaspectin A (**57**)



Neobonaspectin B (**58**)

**Abbildung 2.33:** Strukturen der aus *Bonamia spectabilis* isolierten Sesqueneolignane **57-58** (relative Konfiguration).

## 2.3.2 Pharmakologische Untersuchung von *Bonamia spectabilis*

### *In-vitro*-Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*

Die Ergebnisse des *in-vitro*-Testes sind in Tabelle 2.18 dargestellt. Um einen besseren Vergleich der Aktivitäten untereinander zu gewährleisten, wird im Folgenden nur auf die molaren Werte der einzelnen Verbindungen eingegangen.

Bonaspectin C 4''- $\beta$ -glukosid (**50**), sein durch Hydrolyse hergestelltes Aglykon (**51**) und Bonaspectin D 4''- $\beta$ -glukosid (**52**) erwiesen sich von den aus *B. spectabilis* isolierten Lignanoiden am effektivsten. Die  $IC_{50}$ -Werte waren mit 1.3, 2.0 und 6.5  $\mu$ M (PoW) bzw. 1.7, 4.6 und 3.7  $\mu$ M (Dd2) bemerkenswert niedrig. Bonaspectin A (**48**) und die Isomerenmische (**53/54** und **55/56**) besaßen dagegen nur eine moderate bis schwache Aktivität ( $IC_{50}$ -Werte 12.9 - 26.6  $\mu$ M) gegenüber *P. falciparum*. Die einfachen Hexamethoxyignane (**46** und **47**) zeigten praktisch keine Aktivität mehr. Beim Vergleich der Aktivitäten fiel auf, dass im Falle der Tetrahydrofuranerivate die dimeren Verbindungen eine deutlich

**Tabelle 2.18:** *In-vitro*-Aktivität der Lignanoide **45-48** und **50-58** isoliert aus *Bonamia spectabilis* gegen *Plasmodium falciparum*.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Werte <sup>a</sup>			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
<i>Lignane/Neolignane</i>				
Violongin A ( <b>45</b> )	5.0	12.4	6.0	14.9
Epigrandisin ( <b>46</b> )	46.0	106.5	> 50	> 115
Hexamethoxylignan ( <b>47</b> )	50.0	115.7	36.8	85.2
<i>Sesquilignane</i>				
Bonaspectin A ( <b>48</b> )	8.1	12.9	8.2	13.1
Bonaspectin C-4''-β-glukosid ( <b>50</b> ) <sup>b</sup>	<b>0.98</b>	<b>1.3</b>	<b>1.3</b>	<b>1.7</b>
Bonaspectin C ( <b>51</b> )	<b>1.2</b>	<b>2.0</b>	<b>2.8</b>	<b>4.6</b>
Bonaspectin D-4''-β-glukosid ( <b>52</b> )	<b>5.1</b>	<b>6.5</b>	<b>2.9</b>	<b>3.7</b>
Bonaspectin E/F ( <b>53/54</b> ) <sup>c</sup>	16.2	25.2	17.1	26.6
Bonaspectin G/H ( <b>55/56</b> ) <sup>c</sup>	16.9	24.7	15.6	22.8
<i>Sesquineolignane</i>				
Neobonaspectin A ( <b>57</b> )	6.5	9.9	7.1	10.9
Neobonaspectin B ( <b>58</b> )	3.0	5.0	5.1	8.5
<i>Kontrolle</i>				
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.008	0.015	0.073	0.14

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten<sup>b</sup> Mittelwert aus vier unabhängigen Testansätzen<sup>c</sup> im Gemisch getestet

schwächere Aktivität als die strukturell verwandten Trimere zeigten.

Bei den Neolignanen war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt. Dennoch war Violongin A (**45**) mit IC<sub>50</sub>-Werten von 12.4 µM (PoW) und 14.9 µM (Dd2) schwächer wirksam als die beiden Sesquineolignane **57** und **58** (IC<sub>50</sub>-Werte: 9.9, 5.0 µM [PoW] und 10.9, 8.5 µM [Dd2]).

### *In-vitro*-Aktivität gegen ECV-304-Zellen

Im Rahmen der zelltoxikologischen Untersuchungen wurde auch der Einfluß von Bonaspectin C-4''-β-glukosid (**50**) auf das Wachstum von ECV-304-Zellen untersucht, da diese Substanz im antiplasmodialen Test die stärkste Aktivität aufwies. Erfreulicherweise zeigte sich bei **50** nur eine geringe Toxizität. Der IC<sub>50</sub>-Wert lag bei 39.8 µg/ml bzw 52.8 µM, der Selektivitätsindex somit zwischen 30 und 40. Eine allgemeine Zytotoxizität scheidet daher als Wirkmechanismus für die antiplasmodiale Aktivität aus.

### 2.3.3 Untersuchung der Empfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* gegenüber Bonaspectin C 4''- $\beta$ -glukosid (**50**) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium

Bei der Wiederholung des *in-vitro*-Tests fiel auf, dass die 50 %ige Hemmkonzentration von Bonaspectin C 4''- $\beta$ -glukosid (**50**) gegenüber dem Malariaerreger stark schwankte (< 0.4-2.0  $\mu\text{g/ml}$ ). Da der Test mit asynchronen *Plasmodium*-Kulturen durchgeführt wurde, sollte untersucht werden, ob **50** bevorzugt in einem Entwicklungsstadium von *P. falciparum* angreift.

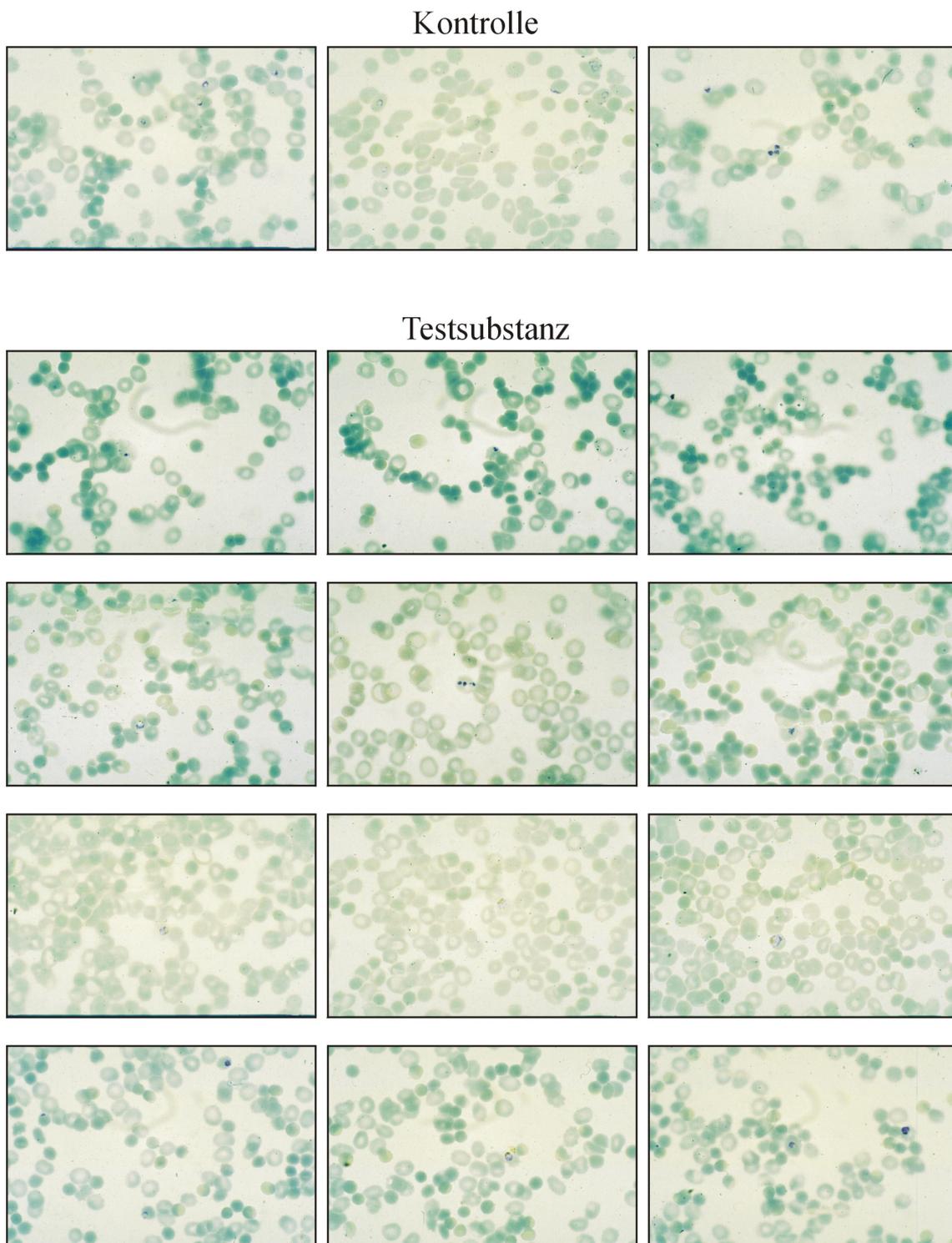
**Tabelle 2.19:** Effekt von Bonaspectin C-4''- $\beta$ -glukosid (**50**) auf *Plasmodium falciparum*<sup>a</sup> (Dd2) nach 48 h Inkubation.

<b>A Ringformen</b>				
Konzentration von <b>50</b> in $\mu\text{g/ml}$	Ringe	Trophozoiten	Schizonten	Parasitämie <sup>b</sup> in %
0.0 (Kontrolle) <sup>c</sup>	67	64	14	2.42
25.0	1	8	0	0.15
12.5	2	14	0	0.27
6.25	0	12	0	0.20
3.125	1	20	0	0.34
1.56	1	9	6	0.20
0.78	3	13	0	0.26
0.39	22	30	4	0.89
<b>B Schizonten</b>				
Konzentration von <b>50</b> in $\mu\text{g/ml}$	Ringe	Trophozoiten	Schizonten	Parasitämie <sup>b</sup> in %
0.0 (Kontrolle) <sup>c</sup>	66	34	116	3.80
25.0	11	1	0	0.20
12.5	24	4	1	0.50
6.25	28	17	1	0.76
3.125	11	48	0	0.96
1.56	13	89	2	1.72
0.78	4	120	10	2.20
0.39	12	74	47	2.20

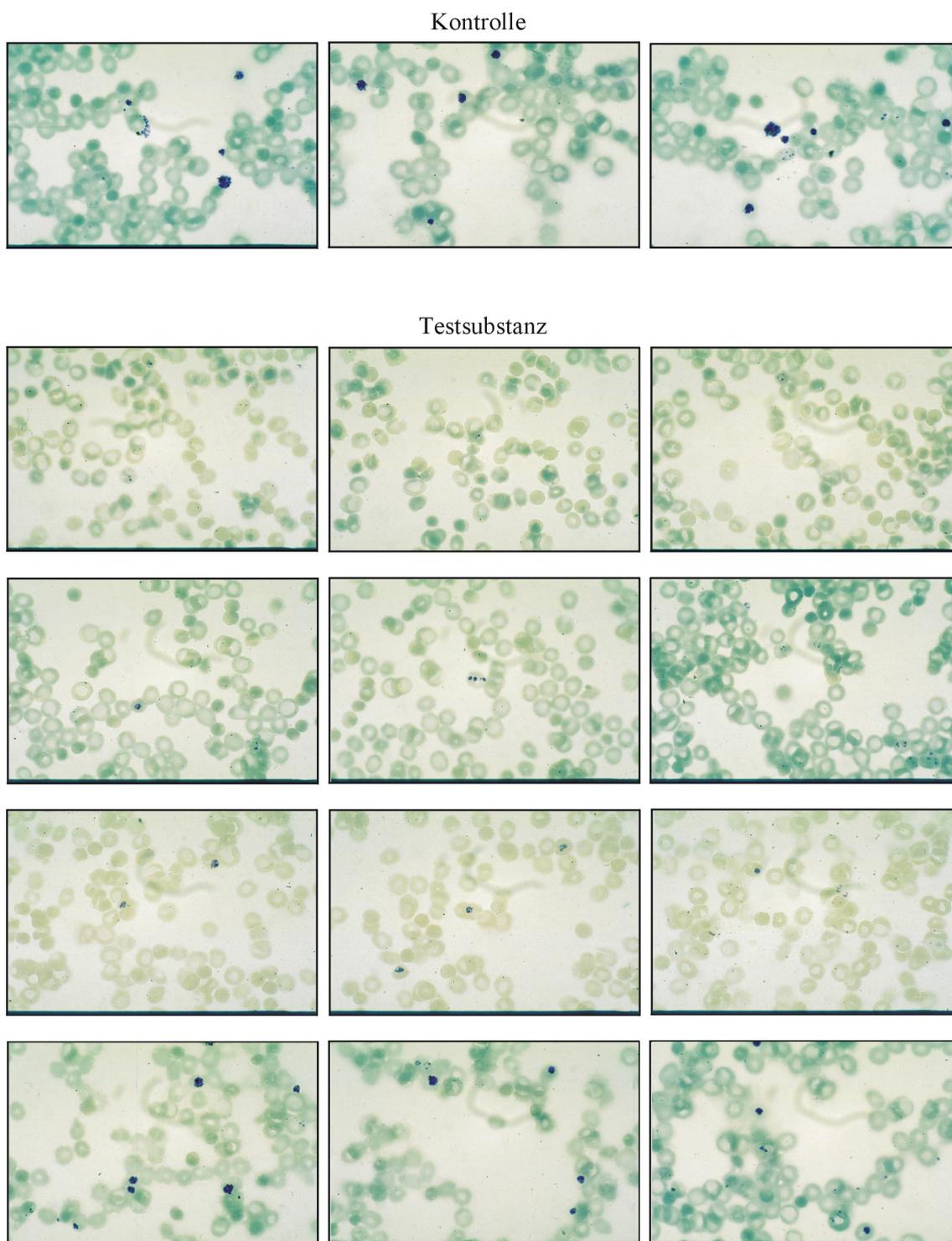
<sup>a</sup> Intraerythrozytäre Parasiten pro 6000 Zellen, einzeln gezählt als Ringe, Trophozoiten und Schizonten, aufsummiert aus Triplikaten

<sup>b</sup> Ringe, Trophozoiten und Schizonten wurden als eins pro infiziertem Erythrozyten gezählt

<sup>c</sup> Parasitenstadien nach 48 h ohne Zugabe der Testsubstanz



**Abbildung 2.34:** Effekt von Bonaspectin C-4'- $\beta$ -glukosid (**50**) auf *Plasmodium falciparum* (Dd2) nach 48 h Inkubation im Blutausstrich nach GIEMSA (Experiment A). Kontrolle: Parasitenkultur nach 48 h ohne Zugabe der Testsubstanz. Testsubstanz: Parasitenkultur nach 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz ( $c_B$ ); 1. Reihe von oben:  $c_B = 25.0 \mu\text{g/ml}$ ; 2. Reihe:  $c_B = 6.25 \mu\text{g/ml}$ ; 3. Reihe:  $c_B = 1.56 \mu\text{g/ml}$ ; 4. Reihe:  $c_B = 0.39 \mu\text{g/ml}$ ;



**Abbildung 2.35:** Effekt von Bonaspectin C-4'- $\beta$ -glukosid (**50**) auf *Plasmodium falciparum* (Dd2) nach 48 h Inkubation im Blutausstrich nach GIEMSA (Experiment B). Kontrolle: Parasitenkultur nach 48 h ohne Zugabe der Testsubstanz. Testsubstanz: Parasitenkultur nach 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz ( $c_B$ ); 1. Reihe von oben:  $c_B = 25.0 \mu\text{g/ml}$ ; 2. Reihe:  $c_B = 6.25 \mu\text{g/ml}$ ; 3. Reihe:  $c_B = 1.56 \mu\text{g/ml}$ ; 4. Reihe:  $c_B = 0.39 \mu\text{g/ml}$ ;

Die Synchronisierung der Kulturen und die Auswertung des Experimentes sind in den Kapiteln 5.4.2.9 und 5.4.3.4 beschrieben. Die synchronisierten Kulturen wurden als Triplikate in Gegenwart von **50** in verschiedenen Konzentrationen (25.0 bis 0.39  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 48 h auf 96-Loch-Mikrotiterplatten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden von jedem Loch Giemsa-gefärbte Ausstriche hergestellt und zur Auswertung mindestens 2000 Zellen pro Loch ausgezählt. Jedes Entwicklungsstadium (Ring, Trophozoit, Schizont) wurde einzeln gezählt, wobei allerdings nicht zwischen vitalen und bereits abgestorbenen Parasiten differenziert werden konnte. Die Ergebnisse dieser visuellen Auswertung sind in Tabelle 2.19 zusammengefaßt und in den Abbildungen 2.34 und 2.35 nochmals photographisch dargestellt.

Im ersten Experiment (Abb. 2.34, Tab. 2.19 A) wurde die Testsubstanz zu Kulturen, die überwiegend Ringformen enthielten, zugegeben. Nach 48 h war die Entwicklung der Parasiten bei allen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur verzögert und der Reifeprozess der Trophozoiten zu Schizonten gehemmt. Darüber hinaus wiesen die Parasiten morphologisch anormale Veränderungen auf oder erschienen tot. Dieser Effekt war im zweiten Experiment noch deutlicher (Abb. 2.35, Tab. 2.19 B). Diesmal wurde die Testsubstanz zu Kulturen mit überwiegend Schizonten hinzugegeben. Reife Schizonten erschienen hier erst bei einer Konzentration des Sesquiligans von  $< 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Offensichtlich reagieren die Parasiten im Trophozoitenstadium besonders empfindlich auf Bonaspectin C 4''- $\beta$ -glukosid (**50**).

### 2.3.4 Weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf den Wirkmechanismus von Bonaspectin C 4''- $\beta$ -glukosid (**50**)

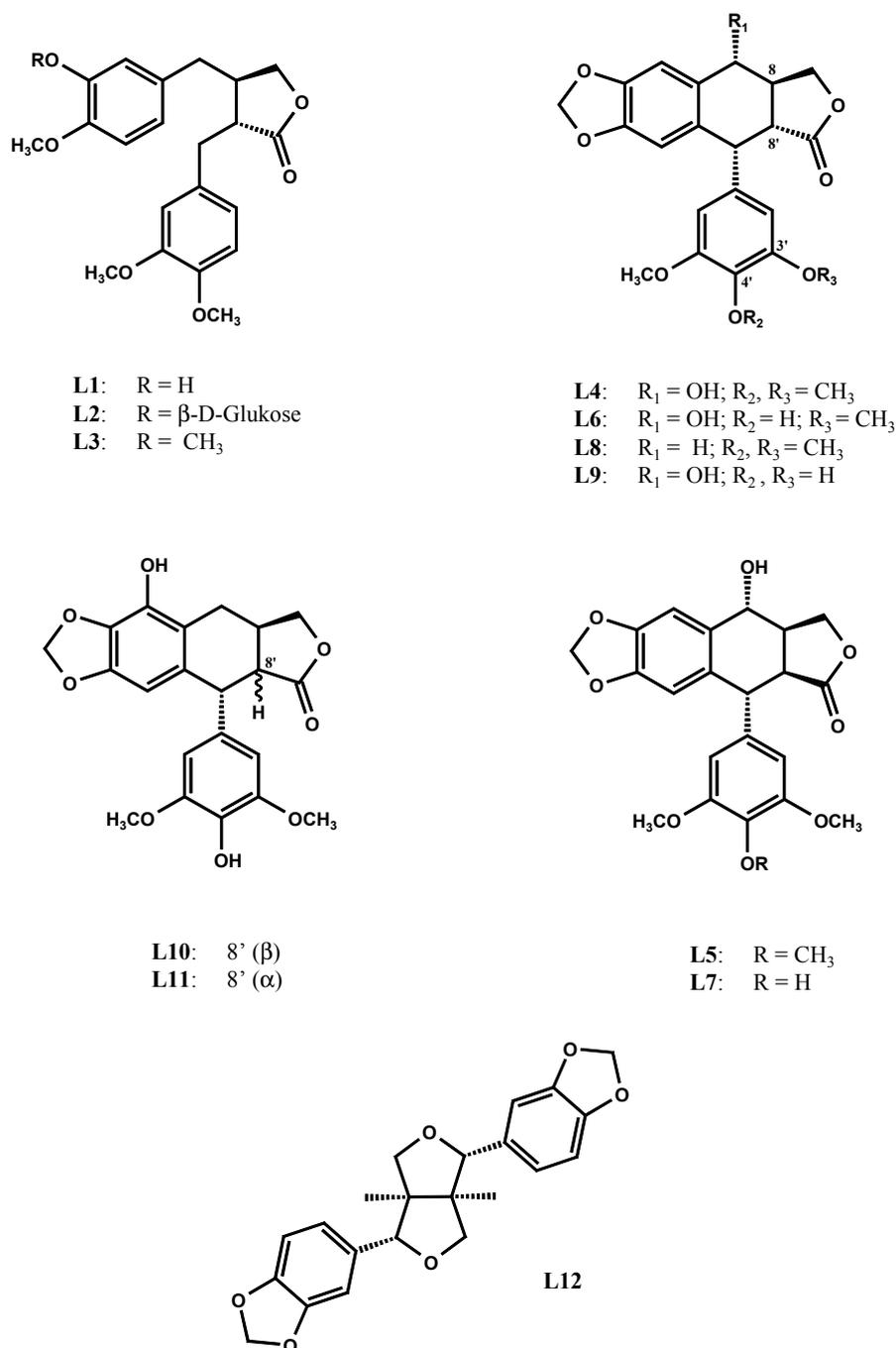
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwölf weitere Lignane (**L1-L12**, Abb. 2.36), insbesondere vom Typ der Cyclolignanole, auf ihre antiplasmodiale und zytotoxische Aktivität hin getestet. Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Zeigen Vertreter weiterer Lignangrundtypen eine Aktivität gegen *P. falciparum*?
2. Inwieweit beeinflusst der Methylierungsgrad die Aktivität?
3. Gibt es Hinweise auf den Wirkmechanismus von Bonaspectin C 4''- $\beta$ -glukosid (**50**)?

Die getesteten Lignane waren im Arbeitskreis aufgrund vorangegangener Untersuchungen an der HIV-Integrase vorhanden. Es handelte sich teils um Naturstoffe, teils um Partial-synthetika (Eich et al., 1996).

Die Aktivitäten der verschiedenen Lignanoide sind in Tabelle 2.20 angegeben, zum direkten Vergleich ist auf die Angabe der  $\text{IC}_{50}$ -Werte in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verzichtet worden. Zwischen dem Chloroquin-sensitiven Stamm PoW und dem Chloroquin-resistenten Klon Dd2 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Zur Bestimmung der Selektivitätsindizes wurden die für Dd2 bestimmten Daten verwendet.

Arctigenin (**L1**) und seine Derivate (**L2** und **L3**) besaßen keine nennenswerten *in-vitro*-Aktivitäten ( $\text{IC}_{50}$ -Werte  $> 90 \mu\text{M}$ ), so dass von einer Bestimmung der Zytotoxizität abgesehen wurde.



**Abbildung 2.36:** Strukturen verschiedener gegen *Plasmodium falciparum* getesteter Lignanoide vom Dibenzylbutyrolakton-Typ, Cyclolignanolid-Typ und Furofuran-Typ (relative Konfiguration).

Während das *trans*(8,8')-konfigurierte  $\alpha$ -Peltatin (**L10**) eine Aktivität von 5.3 (PoW) und 5.0 (Dd2)  $\mu$ M zeigte, erwies sich das *cis*-Epimer (**L11**) als inaktiv (IC<sub>50</sub>-Wert > 50  $\mu$ M). Unter den von Podophyllotoxin (**L4**) abgeleiteten Lignanenen (**L5-L9**) zeigte Desoxypodophyllotoxin (**L8**) die stärkste Aktivität mit IC<sub>50</sub>-Werten von 4.2 (PoW) und 5.3 (Dd2)  $\mu$ M. Während Podophyllotoxin (**L4**) selbst IC<sub>50</sub>-Werte von 12.8 (PoW) und 11.4 (Dd2)  $\mu$ M

aufwies, konnte für die korrespondierenden Demethylderivate (**L6** und **L9**) und die beiden *cis*-Epimere, Picropodophyllotoxin (**L5**) und 4'-Demethylpicropodophyllotoxin (**L7**), keine Aktivität gegen *P. falciparum* nachgewiesen werden ( $IC_{50}$ -Werte  $> 50 \mu M$ ).

Auch Sesamin (**L12**), ein Lignan vom Furofuran-Typ, war inaktiv ( $IC_{50}$ -Werte  $> 60 \mu M$ ). Einige ausgewählte Verbindungen wurden darüber hinaus hinsichtlich ihrer Zytotoxizität überprüft (Tab. 2.20).

Wie erwartet zeigten insbesondere die Podophyllotoxine (**L4**, **L6** und **L8**) und **L10** eine starke Wachstumshemmung gegenüber den ECV-304-Zellen ( $IC_{50}$ -Werte: 0.014, 0.015 bzw.  $0.0015 \mu M$ ) und waren im Vergleich zu ihrer antiplasmodialen Aktivität bis zu vier Zehnerpotenzen stärker zytotoxisch wirksam ( $SI [L6] = 3.2 \times 10^{-4}$ ).

**Tabelle 2.20:** *In-vitro*-Aktivitäten diverser Lignanoide (**L1-L12**, **46**, **50** und **51**) gegen *Plasmodium falciparum* und gegen die Zelllinie ECV-304.

Lignanoide	$IC_{50}$ -Werte in $\mu M^a$			SI <sup>b</sup>
	PoW	Dd2	ECV-304	
<i>Dibenzylbutyrolakton-Typ</i>				
Arctigenin ( <b>L1</b> )	132.3	108.3	n.b.	-
Arctiin ( <b>L2</b> )	> 93	> 93	n.b.	-
Arctigeninmethylether ( <b>L3</b> )	114.5	94.0	n.b.	-
<i>Cyclolignanolid-Typ</i>				
Podophyllotoxin ( <b>L4</b> )	12.8	11.4	0.014	$1.2 \times 10^{-3}$
Picropodophyllotoxin ( <b>L5</b> )	> 120	82.9	0.86	0.01
4'-Demethylpodophyllotoxin ( <b>L6</b> )	69.3	46.8	0.015	$3.2 \times 10^{-4}$
4'-Demethylpicropodophyllotoxin ( <b>L7</b> )	> 125	> 125	2.03	< 0.016
Desoxypodophyllotoxin ( <b>L8</b> )	4.2	5.3	0.015	$2.9 \times 10^{-3}$
3',4'-Didemethylpodophyllotoxin ( <b>L9</b> )	70.7	51.3	0.99	0.02
<i>trans</i> - $\alpha$ -Peltatin ( <b>L10</b> )	5.3	5.0	1.0015	$3.0 \times 10^{-3}$
<i>cis</i> - $\alpha$ -Peltatin ( <b>L11</b> )	58.3	61.3	0.11	$1.8 \times 10^{-3}$
<i>Furofuran-Typ</i>				
Sesamin ( <b>L12</b> )	61.3	68.6	n.b.	-
<i>Tetrahydrofuran-Typ</i>				
Epigrandisin ( <b>46</b> )	106.5	> 115	n.b.	-
Bonaspectin C-4''- $\beta$ -glukosid ( <b>50</b> )	<b>1.3</b>	<b>1.7</b>	<b>52.8</b>	<b>31.1</b>
Bonaspectin C ( <b>51</b> )	2.0	4.6	n.b.	-
<i>Kontrolle</i>				
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.015	0.14	58.1	415.0

<sup>a</sup> Anzahl der Experimente: 3 (Dd2); 8 (ECV-304)

<sup>b</sup> Berechnung (bezogen auf Dd2) s. a. Kap. 5.4.5

n.b.: nicht bestimmt

Demethylierung und Konfigurationsänderung an C-8' (Picropodophyllotoxine) führten auch hier zu einem Wirkungsverlust, allerdings war die zytotoxische Aktivität, z. B. im Falle von **L5**, dennoch um zwei Zehnerpotenzen höher als die entsprechende antiplasmodiale Aktivität (SI = 0.01). Die hohe Zytotoxizität ist bei Podophyllotoxin (**L4**), welches z. B. im Rhizom von *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae) vorkommt, auf eine Hemmung der Mitose zurückzuführen. Ein essentielles Strukturelement dabei ist der 3,4,5-trimethoxylierte Aromat, wie er auch bei anderen biogenen Mitosehemmstoffen, z. B. Colchicin aus den Samen von *Colchicum autumnale* L. (Colchicaceae), vorkommt (Rimpler, 1990). Beide Substanzen werden daher pharmazeutisch nur sehr selten eingesetzt (z. B. das Harz aus *P. peltatum* zur äußerlichen Anwendung bei Feigwarzen; Colchicin im akuten Gichtanfall).

Anhand der Ergebnisse scheint festzustehen, dass diese für den Säuger hochtoxischen Lignane nicht in gleicher Weise mit den parasitären Zellteilungsprozessen interagieren.

Interessanterweise besitzen die aus *B. spectabilis* isolierten Lignane (Tab. 2.18 und 2.20), insbesondere Bonaspectin C-4''- $\beta$ -glukosid (**50**), ebenfalls eine Trimethoxyphenyl-Partialstruktur. **50** wies dabei aber nur eine sehr geringe Toxizität gegenüber den ECV-304-Zellen auf (IC<sub>50</sub>-Wert 52.8  $\mu$ M). Anhand des Selektivitätsindex (SI = 31.1) ließ sich eine leichte Selektivität für den Malariaerreger ablesen. Für die antiplasmodiale Aktivität war es nicht relevant, ob die dritte Phenylpropaneinheit der Sesquilignane eine freie Hydroxygruppe (**51**) aufwies oder glukosidisch verknüpft war (**50**). Allerdings ist diese dritte Phenylpropaneinheit generell für die Aktivität wichtig, zeigt doch das einfache Hexamethoxylicnan (**46**) keine antiparasitären Eigenschaften.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die antiplasmodiale Aktivität von Bonaspectin C-4''- $\beta$ -glukosid (**50**) vermutlich nicht auf eine Hemmung der Mitose zurückzuführen ist.

### 2.3.5 Pharmakologische Untersuchungen verschiedener Teezubereitungen von *Artemisia annua*

Neben phytochemischen und pharmakologischen Untersuchungen von traditionellen Heilpflanzen im Hinblick auf die Entwicklung neuer Antimalariamittel gibt es zudem Bemühungen, klinische Studien über die Verwendung von Heilpflanzen in afrikanischen Malaria-gebieten durchzuführen. Ziel solcher Programme ist es, zu überprüfen, ob die Anwendung von Heilpflanzen nicht auch als Behandlungsalternative in naturwissenschaftlich ausgerichteten Basisgesundheitsdiensten genutzt werden sollte.

Die Bedeutung der Heilpflanzen in der Volksmedizin ist unumstritten, zumal in den ländlichen Regionen diese in der Regel verfügbar und auch bezahlbar sind. Es gibt aber noch keine weitreichenden Programme, um die Verwendung von Heilpflanzen und deren Zubereitungen klinisch zu überprüfen. Bei der Zusammenarbeit von westlicher und traditioneller Medizin stößt man oftmals auf Hindernisse. Die Therapiekonzepte der traditionellen Heiler sind für westliche Mediziner nicht immer nachvollziehbar, auch fehlen häufig genaue Angaben über die Dosierung, sowie die pharmakokinetischen, pharmakodynamischen und toxikologischen Eigenschaften der verwendeten Extrakte.

Es gibt aber auch erste positive Ansätze. Im Hospital Nebobongo im Nordosten Kongos (vorm. Zaire) wurde 1995 mit der Anlage eines Arzneipflanzengartens begonnen. In dieser Region war es aufgrund wirtschaftlicher Probleme häufig zu Engpässen in der medizinischen Versorgung gekommen. Durch den eigenen Anbau war es nun möglich, einige Medikamente aus den Arzneipflanzen lokal selbst herzustellen. Nach anfänglichem Zögern nahmen auch mehrere traditionelle Heiler regen Anteil an der Initiative.



**Abbildung 2.37:** *Artemisia annua* L., Asteraceae.

Müller und Mitarbeiter untersuchten im Rahmen dieses Projektes die Anwendung von wässrigen Extrakten aus dem Kraut von *Artemisia annua* L., Asteraceae, (Abb. 2.37, s. a. Kap. 1.2.1.2), die als nicht einheimische Pflanzenart ebenfalls im Arzneipflanzengarten des Krankenhauses angebaut wurde. Während in den letzten 30 Jahren diese Heilpflanze hinsichtlich ihrer Wirkstoffe sehr genau untersucht wurde, blieb die Frage der Wirksamkeit der traditionellen Teezubereitung gegen Malaria noch ungeklärt. In ersten Anwendungsbeobachtungen (Dosis: Infus aus 5 g getrockneten Blättern pro Liter, der Tee wurde über den Tag verteilt getrunken) an 48 semiimmunen Patienten konnte eine Abnahme der Plasmodiendichte im Blut gezeigt werden. 37 Patienten gaben nach fünf Behandlungstagen sogar eine völlige Beschwerdefreiheit an. Die Untersuchungen sind noch nicht abgeschlos-

sen. 2001 wurde eine randomisierte und kontrollierte Studie vorbereitet, von der allerdings noch keine Ergebnisse vorliegen (Müller und Heide, 2001).

Da es kaum Literaturangaben über die *in-vitro*-Aktivität wässriger Extrakte aus dem Kraut von *A. annua* gibt (Versuche von Klayman (1985) schlugen fehl) sollten im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem Deutschen Institut für Ärztliche Mission (DIFÄM, Dr. med. Markus Müller) und dem Institut für Pharmazie der Universität Tübingen (Prof. Dr. Lutz Heide) folgende Fragen geklärt werden:

1. Zeigen wässrige Extrakte aus dem Kraut von *A. annua* eine *in-vitro*-Aktivität gegen *P. falciparum*?
2. Ist ein direkter Vergleich der Aktivitäten von reinem Artemisinin und den Teezubereitungen möglich?
3. Können additive oder synergistische Effekte anderer Inhaltsstoffe in den Extrakten beobachtet werden?

Die Krautdroge von *A. annua* wurde in Tübingen durch institutseigenen Anbau gezogen und im Herbst 1999 geerntet. Die dortige Drogenanalyse ergab einen Artemisiningehalt von 1.03 %. Es wurden insgesamt fünf verschiedene Teezubereitungen (Kap. 5.3.2) hergestellt. Der Gehalt an Artemisinin (Tab. 2.21) in diesen wässrigen Extrakten wurde mittels HPLC von Mitarbeitern der Universität Tübingen ermittelt und lag zwischen 7.2 und 22.0 mg/l je nach Herstellungsmethode. Zum Vergleich wurde zusätzlich ein lipophiler (PE/EtOAc) und ein hydrophiler Extrakt (MeOH/H<sub>2</sub>O) aus 10 g Droge nach der herkömmlichen Methode (Kap. 5.3.1) hergestellt. Alle Extrakte wurden auf ihre *in-vitro*-Aktivität getestet, die Ergebnisse sind in Tabelle 2.21 dargestellt.

**Tabelle 2.21:** *In-vitro*-Aktivität verschiedener Teezubereitungen von *Artemisia annua* gegen *Plasmodium falciparum*.

Extrakte	IC <sub>50</sub> -Werte (µg/ml) ± SD <sup>a</sup>	
	PoW	Dd2
<i>Extrakte</i>		
Lipophiler Extrakt	< 0.015	0.024
Hydrophiler Extrakt	0.98	3.28
Infus (2.5 g/500 ml, 15 min; <i>c<sub>A</sub></i> = 12.0 mg/l)	0.074 ± 0.220	0.143 ± 0.063
Dekokt (2.5 g/500 ml, 5 min; <i>c<sub>A</sub></i> = 7.2 mg/l)	0.080 ± 0.025	0.153 ± 0.060
Dekokt (2.5 g/500 ml, 30 min; <i>c<sub>A</sub></i> unbekannt)	0.233 ± 0.053	0.442 ± 0.188
Infus (4.5 g/500 ml, 15 min; <i>c<sub>A</sub></i> = 22.0 mg/l)	0.044 ± 0.032	0.141 ± 0.039
Dekokt (4.5 g/500 ml, 5 min; <i>c<sub>A</sub></i> = 13.0 mg/l)	0.037 ± 0.037	0.121 ± 0.060
<i>Kontrolle</i>		
Artemisinin	0.0008	0.004
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.008	0.092

<sup>a</sup> getestet als Triplikate in drei unabhängigen Experimenten

*c<sub>A</sub>*: erwartete Artemisininkonzentration im wässrigen Extrakt lt. Angabe der Universität Tübingen

Wie erwartet, zeigte sich der lipophile Extrakt hochaktiv ( $IC_{50}$ -Werte:  $< 0.015 \mu\text{g/ml}$  [PoW];  $0.024 \mu\text{g/ml}$  [Dd2]). Anhand der Werte ist anzunehmen, dass ein hoher Anteil an Artemisinin in die lipophile Phase übergegangen ist. Der hydrophile Extrakt war etwa 130 mal (Dd2) schwächer wirksam.

Wie bereits oben erwähnt, konnte durch chromatographische Analyse der Teezubereitungen gezeigt werden, dass das sehr lipophile Artemisinin auch in die wässrige Phase übergeht. Alle wässrigen Extrakte zeigten eine gute bis sehr gute Aktivität gegenüber *P. falciparum* mit annähernd gleichen Werten wie die Chloroquin-Kontrolle. Im Vergleich zu reinem Artemisinin waren die Teezubereitungen aufgrund der geringeren Artemisininkonzentration weniger aktiv. Die Erhöhung der Drogenmenge von 2.5 auf 4.5 g führte zur Verdopplung des gelösten Artemisininanteils und damit im Falle von PoW in etwa zur Halbierung der  $IC_{50}$ -Werte. Für Dd2 konnten in diesem Fall keine nennenswerten Aktivitätsunterschiede festgestellt werden.

Ein detaillierter Vergleich der Herstellungsmethoden anhand der  $IC_{50}$ -Werte ist aufgrund der großen Streuung der Werte schwer möglich. Allerdings wies der Dekokt (2.5 g/500 ml, 30 min.) eindeutig die geringste Aktivität auf. Dies deutet auf eine Hitzelabilität des Sesquiterpens hin, so dass diese Herstellungsmethode nicht empfehlenswert ist.

Abgesehen von der bestehenden Problematik der Übertragbarkeit von *in-vitro*-Ergebnissen auf *in-vivo*-Bedingungen, sind positive Effekte bei der Behandlung von Malariapatienten mit Teezubereitungen aus *A. annua* also denkbar. Somit unterstützen die vorliegenden Ergebnisse die Arbeiten von Müller et al. (2000) und Müller und Heide (2001).

Blieb noch die Frage, ob eventuell additive oder synergistische Effekte vorliegen. Dazu ist allerdings eine Abschätzung der absoluten Artemisininmenge im getesteten Trockenextrakt nötig. Dies soll hier exemplarisch am Beispiel des Dekokts (4.5 g/500 ml, 5 min.;  $c_A^2 = 13.0 \text{ mg/ml}$ ) erläutert werden:

Aus 500 ml Dekokt wurden 700 mg Trockenextrakt gewonnen. Unter der Voraussetzung, dass der theoretisch erwartete Artemisinin-Anteil vollständig im Trockenextrakt vorliegt, enthält dieser  $0.5 \text{ l} \times 13 \text{ mg/l} = 6.5 \text{ mg}$  Artemisinin. Daraus ergibt sich ein Artemisingehalt von  $6.5 \text{ mg Artemisinin} / 700 \text{ mg Trockenextrakt} = 0.0093$  pro Mengeneinheit Trockenextrakt. Die Dekoktkonzentration von  $0.037 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $0.121 \mu\text{g/ml}$  ( $IC_{50}$ -Werte PoW bzw. Dd2) entspricht also einer Artemisininkonzentration von  $0.0093 \times 0.037 \mu\text{g/ml} = 0.0003 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $0.0093 \times 0.121 \mu\text{g/ml} = 0.0011 \mu\text{g/ml}$ .

Diese errechneten Werte liegen unter denen für reines Artemisinin ( $IC_{50}$ -Werte:  $0.0008 \mu\text{g/ml}$  [PoW];  $0.004 \mu\text{g/ml}$  [Dd2]), was, trotz relativ großer Streuung der Meßwerte, auf additive oder synergistische Effekte hindeuten könnte. Für eine eindeutige Aussage wären weitere Untersuchungen sowie die genaue Bestimmung des Artemisingehalts im Trockenextrakt nötig. Im Falle der polymethoxylierten Flavonoide aus *A. annua* ist ein synergistischer Effekt bereits bewiesen worden (Elford et al., 1987; Liu et al., 1989), dennoch bleibt die Frage nach weiteren additiv wirkenden Inhaltsstoffen (z. B. aus der Gruppe der Sesquiterpene), die im wässrigen Extrakt enthalten sein könnten, offen.

---

<sup>2</sup>erwartete Artemisininkonzentration im wässrigen Extrakt lt. Angabe der Universität Tübingen

### 2.3.6 Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Birkenblättern und Orthosiphonblättern

Bei den phytochemischen Untersuchungen der traditionell genutzten Heilpflanzen wurden in mehreren Fällen diverse Flavonoide, wie Flavone (Kap. 2.2.5.2), Isoflavone (Kap. 2.2.1.1) oder Phenylcumarine (Köhler et al., 2001), aus den aktiven Fraktionen gewonnen. Strukturell auffällig war, dass viele der isolierten Naturstoffe mehrfach methoxyliert vorlagen. Der lipophile Charakter schien für die gute bis moderate antiplasmodiale Aktivität eine wichtige Rolle zu spielen.

Daraufhin wurden in Mitteleuropa genutzte Drogen untersucht, die aufgrund ihres hohen Flavonoidgehaltes verwendet werden. So sollte zum einen untersucht werden, ob Flavonoiddrogen eine Aktivität gegen *P. falciparum* aufweisen, zum anderen sollte das Spektrum der untersuchten Flavonderivate erweitert werden, um eventuell nähere Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen machen zu können.

Insgesamt wurden vier im Handel befindliche Arzneidrogen, Birkenblätter (*Betula*-Arten, z. B. *B. pendula* ROTH, Betulaceae, Abb. 2.38), Goldrutenkraut (*Solidago*-Arten, z. B. *S. gigantea* AIT., Asteraceae), Lindenblüten (*Tilia*-Arten, z. B. *T. cordata* MILL., Tiliaceae) und Orthosiphonblätter (*Orthosiphon*-Arten, z. B. *O. aristatus* (BL.) MIQ., Lamiaceae, Abb. 2.39) ausgesucht. Die daraus hergestellten lipophilen Extrakte (Kap. 5.3.1) wurden zunächst auf ihre *in-vitro*-Aktivität getestet, die IC<sub>50</sub>-Werte sind in Tabelle 2.22 angegeben.

**Tabelle 2.22:** *In-vitro*-Aktivität der lipophilen Extrakte (PE/EtOAc 1:1 [V/V]) ausgewählter, im Handel befindlicher, Arzneidrogen gegen *Plasmodium falciparum*.

Arzneidroge	IC <sub>50</sub> -Werte (µg/ml) <sup>a</sup>	
	PoW	Dd2
Birkenblätter	20.6	26.3
Goldrutenkraut	46.7	43.8
Lindenblüten	> 50	> 50
Orthosiphonblätter	n.b.	31.7

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten

n.b.: nicht bestimmt

Aufgrund der Ergebnisse wurden Birken- und Orthosiphonblätter im Sinne einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung phytochemisch untersucht (Kap. 5.10, 5.11).

#### 2.3.6.1 Phytochemische Untersuchung von Birkenblättern

Birkenblätter werden in der Pharmazie hauptsächlich zur Durchspülung bei bakteriellen und entzündlichen Erkrankungen der ableitenden Harnwege eingesetzt. Das Europäische Arzneibuch (Nachtrag 1999) fordert einen Mindestgehalt an Flavonoiden, berechnet als Hyperosid (Quercetin-3-*O*-galaktosid), von 1.5 %. Die Flavonoidfraktion besteht

insbesondere aus Hyperosid, Quercetrin (Quercetin-3-*O*-rhamnosid) und Myricetin-3-*O*-digalaktosid. Als weitere Inhaltsstoffe findet man Gerbstoffe (Leucoanthocyanidine und Kaffeesäurederivate) und Triterpene vom Dammarantyp (Wichtl, 1997).



Abbildung 2.38: *Betula pendula* ROTH, Betulaceae.

### 2.3.6.2 Strukturaufklärung des Flavons **59**

Aus dem lipophilen Extrakt der Blätter konnte das Flavonoid **59** isoliert werden (Kap. 5.10). Die Struktur wurde anhand von EI-MS- und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sowie NOE-Experimenten aufgeklärt.

#### Strukturaufklärung von Pectolinarigenin (**59**)

Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülionpeak bei  $m/z$  314, die beiden Fragmente bei  $m/z$  299 und 284 deuteten den Verlust von zwei Methylgruppen an.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte zwei Singulets für zwei isolierte aromatische Protonen bei  $\delta$  6.64 und 6.68 ppm, von denen ein Signal dem Proton an C-3 ( $\delta$  6.64 ppm, 1H, *s*) eines Flavons zugeordnet werden konnte. Darüber hinaus waren die Signale für einen *para*-substituierten Aromaten zu sehen ( $\delta$  7.13 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz,  $\delta$  8.03 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz). Wie schon anhand des Massenspektrums vermutet, erkannte man die Signale zweier Methoxygruppen bei  $\delta$  3.88 und 3.92 ppm (je 3H, *s*). Die Stellung der Methoxygruppen wurde mit Hilfe von NOE-Experimenten bestimmt. Zusätzlich gab das Fragment bei  $m/z$  133 einen Hinweis auf eine Methoxygruppe an Position 4' im Ring B, während die Hydroxygruppe am C-5 frei vorliegen mußte ( $\delta$  13.22 ppm, 1H, *s*).

Somit wurde **59** als 5,7-Dihydroxy-4',6-dimethoxyflavon (Pectolinarigenin, Abb. 2.40) identifiziert. Dieses lipophile Flavon ist ein üblicher Bestandteil des Knospenharzes verschiedener Betulaceen-Arten (Wollenweber, 1974).

### 2.3.6.3 Pharmakologische Untersuchung von Birkenblättern

Das durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung isolierte Pectolinarigenin (**59**) zeigte eine moderate Aktivität (Tab. 2.23) gegenüber dem PoW-Stamm von *P. falciparum* (IC<sub>50</sub>-Wert: 7.1 µg/ml / 22.6 µM). Gegenüber Dd2 erwies sich **59** als inaktiv.

### 2.3.6.4 Phytochemische Untersuchung von Orthosiphonblättern

Orthosiphonblätter werden wie Birkenblätter als Diuretikum bei Nierenbeckenentzündung oder Blasenkatarrhen eingesetzt. *O. aristatus* ist im tropischen Asien beheimatet und wird z. B. aus Indonesien importiert. Die Droge ist daher auch bekannt als Javanischer oder Indischer Nierentee. Neben dem ätherischen Öl (überwiegend Sesquiterpenkörper) kommen in den Blättern die für die Pflanzenfamilie typischen Lamiaceen-Gerbstoffe, wie Rosmarinsäure, und polymethoxylierte Flavone vor. Ebenso findet man verschiedene Diterpenester, die Orthosiphole (Wichtl, 1997).



Abbildung 2.39: *Orthosiphon aristatus* (BL.) MIQ., Lamiaceae.

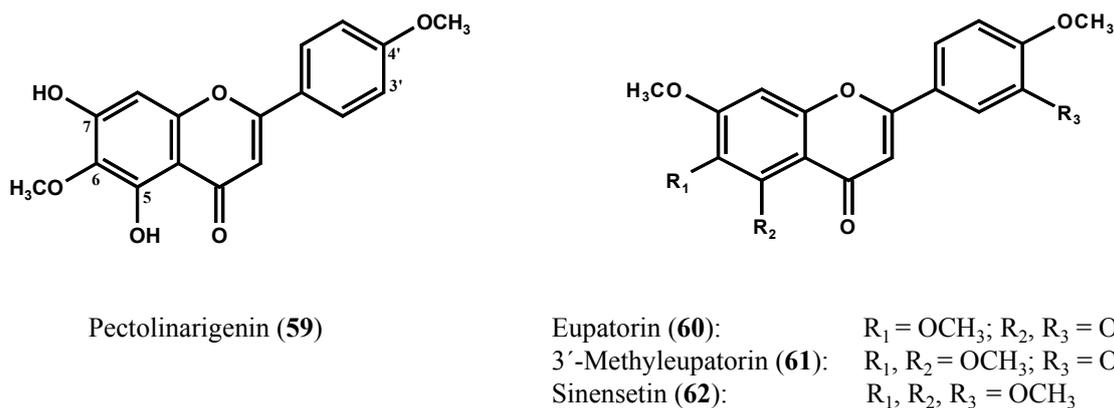
### 2.3.6.5 Strukturaufklärung der Flavone 60-62

Aus den aktiven Fraktionen des lipophilen Blattextraktes konnten ebenfalls lipophile Flavonderivate isoliert werden (Kap. 5.11). Die Strukturen wurden anhand von EI-MS- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren sowie NOE-Experimenten aufgeklärt.

#### Strukturaufklärung von Eupatorin (60)

Das EI-Massenspektrum wies einen deutlichen Molekülionpeak bei *m/z* 344 auf. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte die Signale von insgesamt drei Methoxygruppen ( $\delta$  3.83, 3.95 und 3.98 ppm, je 3H, *s*). Das für die Flavongrundstruktur typische Singulett für H-3 lag bei  $\delta$  6.65 ppm, ein weiteres Singulett für ein isoliertes aromatisches Proton lag bei  $\delta$  6.81 ppm. Zudem ergaben die restlichen drei Signale das Kopplungsmuster eines 1,2,4-trisubstituierten Aromaten ( $\delta$  7.08 ppm, 1H, *d*,  $J = 8.6$  Hz, 7.43 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.4$  Hz,  $\delta$  7.53 ppm, 1H, *dd*,  $J = 2.4$  und 8.6 Hz). Also war das vorliegende Flavon fünffach substituiert, die Zuordnung der drei Methoxygruppen und zwei Hydroxygruppen

erfolgte mit Hilfe von NOE-Experimenten. So führte die Einstrahlung in das Signal bei  $\delta$  3.98 ppm zur Vergrößerung des Signals bei  $\delta$  6.81 ppm. Während das Singulett bei  $\delta$  3.95 ppm mit dem Dublett bei  $\delta$  7.08 ppm korrelierte, konnte für das Signal bei  $\delta$  3.93 ppm keine Korrelation mit einem Proton nachgewiesen werden. Daraufhin ergab sich für **60** die Struktur des 3',5-Dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavons (Eupatorin, Abb. 2.40), welches schon in früheren Arbeiten aus *O. aristatus* isoliert wurde (Sumaryono et al., 1991).



**Abbildung 2.40:** Strukturen der aus Birkenblättern (**59**) und Orthosiphonblättern (**60-62**) isolierten Flavone.

### Strukturaufklärung von 3'-Methyleupatorin (**61**)

Verbindung **61** zeigte im EI-Massenspektrum einen Molekülionpeak bei  $m/z$  358, und besaß somit eine Methylgruppe mehr als Eupatorin (**60**).

Tatsächlich zeigte das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die Singulettts für vier Methoxygruppen ( $\delta$  3.93, 3.97, 3.98 und 3.99 ppm, je 3H, s). Das Substitutionsmuster war identisch mit dem von **60**. Die zusätzliche Methylgruppe mußte an Position 3' stehen, denn die freie Hydroxygruppe an C-5 war deutlich durch das Signal bei  $\delta$  12.75 ppm zu erkennen. Verbindung **61** stellte somit 3'-Methyleupatorin (Abb. 2.40) dar, welches ebenfalls schon in den oberirdischen Pflanzenteilen von *O. aristatus* nachgewiesen werden konnte (Sumaryono et al., 1991).

### Strukturaufklärung von Sinensetin (**62**)

Auch bei **62** handelte es sich um ein Flavonderivat. Die Molmasse betrug 372 (EI-MS). Das Substitutionsmuster war wiederum identisch mit dem von **60** und **61**. Insgesamt besaß das Molekül fünf Methoxygruppen, so dass es sich bei Verbindung **62** um 3',4',5,6,7-Pentamethoxyflavon handelte. Dieses ist unter dem Trivialnamen Sinensetin (Abb. 2.40) bekannt und wurde wie die beiden vorher genannten Flavone bereits aus *O. aristatus* isoliert (Sumaryono et al., 1991).

### 2.3.6.6 Pharmakologische Untersuchung von Orthosiphonblättern

Die Aktivität der isolierten Flavonderivate aus *O. aristatus* (Tab. 2.23) gegen *P. falciparum* war vergleichbar mit den zuvor aus *A. afra* isolierten methoxylierten Flavonen (Kap. 2.2.6). Die aktivste Verbindung war das 3'-Methyleupatorin (**61**); IC<sub>50</sub>-Werte: etwa 2 µg/ml bzw. 6 µM [PoW und Dd2]. **60** und **62** waren schwächer aktiv mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 4.8 und 8.3 µg/ml bzw. 12.9 und 24.1 µM.

**Tabelle 2.23:** *In-vitro*-Aktivität von Flavonen isoliert aus Birkenblättern und Orthosiphonblättern gegen *Plasmodium falciparum*.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Werte <sup>a</sup>			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
<i>Flavone aus Birkenblättern</i>				
Pectolinarigenin ( <b>59</b> )	7.1	22.6	19.4	61.7
<i>Flavone aus Orthosiphonblättern</i>				
Eupatorin ( <b>60</b> )	<b>4.9</b>	<b>14.2</b>	8.3	24.1
3'-Methyleupatorin ( <b>61</b> )	<b>2.3</b>	<b>6.4</b>	<b>2.2</b>	<b>6.1</b>
Sinensetin ( <b>62</b> )	<b>4.8</b>	<b>12.9</b>	<b>6.8</b>	<b>18.3</b>
<i>Kontrolle</i>				
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.008	0.015	0.073	0.14

<sup>a</sup> getestet in Triplikaten

