

3 Experimenteller Teil

3.1 Material

3.1.1 Pflanzenmaterial

Das untersuchte Pflanzenmaterial wurde von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Die Herbarbelege der gesammelten Pflanzen werden an den folgenden Instituten der entsprechenden Kooperationspartner aufbewahrt. Das Pflanzenmaterial aus El Salvador wurde von der Firma Analyticon Discovery GmbH, Hermannswerder Haus 17, 14437 Potsdam, zur Verfügung gestellt.

Kooperierende Universitätsinstitute:

Prof. Dr. Mahabir P. Gupta

Centro de Investigaciones Farmacognosticas de la Flora Panameña (CIFLORPAN) and
Smithsonian Tropical Research Institute,

Universidad de Panama,

Panamá,

Republica de Panama.

Dr. Bernadina Onegi

Department of Pharmacy (Pharmacognosy Unit),

Makerere University,

Kampala,

Uganda

3.1.2 Herkunft

3.1.2.1 *Exostema mexicanum* A. Gray, Rubiaceae

Das Pflanzenmaterial wurde im Dept. Ahuachapán, El Salvador, in einer Höhe von 300 m gesammelt. Das untersuchte Pflanzenmaterial wurde von M. A. Hernández und R. A. Ibarra (ProBioTec, San Salvador, El Salvador) in El Salvador gesammelt. Die

oberirdischen Pflanzenteile wurden für einige Tage luftgetrocknet und anschließend in einer Plastiktüte gelagert. Der Herbarbeleg (DBT 275) befindet sich im Herbarium des Jardín Botánico La Laguna (LAGU) in El Salvador.

Herbarbeleg: (DBT 275).

Beschreibung: Hayden, 2005

3.1.2.2 *Stachytarpheta guatemalensis* Moldenke, Verbenaceae

Blätter und Zweige von *Stachytarpheta guatemalensis* (Moldenke, 1973), Verbenaceae wurden im Gebiet um Panama City von Frau PD Dr. Kristina Jenett-Siems gesammelt und für die phytochemische Untersuchung verwendet. Die Identifikation des Pflanzenmaterials wurde von Prof. Dr. M. D. Correa A. (Herbarium of the University of Panama) durchgeführt.

Zur Untersuchung wurde die Ganzpflanze verwendet.

Herbarbeleg: CIFLORPAN 2756.

Beschreibung: Moldenke, 1973

3.1.2.3 *Momordica foetida* Schum., Cucurbitaceae

Syn: *Momordica morkorra* A. Rich.

Das Pflanzenmaterial wurde in Kisaasi, 10 km nördlich von Kampala, Uganda von Frau Dr. B. Onegi gesammelt. Die Bestimmung des Pflanzenmaterials wurde von dem Botaniker Herrn A. B. Kakooko vorgenommen. Der Herbarbeleg A.B.K.2. befindet sich im Department of Pharmacy (Pharmacognosy Unit), Makerere University, Kampala, Uganda.

Herbarbeleg: A.B.K.2.

Beschreibung: Lind et al. 1962; Hyde & Wursten, 2006

3.1.2.4 *Aspilia africana* (Pers.) C. D. Adams, Asteraceae

Syn: *Aspilia latifolia* Oliver & Hiern

Das Pflanzenmaterial (Blätter und Wurzeln) wurde im Ziika Forest, in Kisubi, 23 km südlich von Kampala, Uganda von Frau Dr. B. Onegi gesammelt. Die Bestimmung der Pflanze erfolgte von dem Botaniker Herrn A. B. Kakooko. Der Herbarbeleg A.B.K.1. befindet sich im Department of Pharmacy (Pharmacognosy Unit), Makerere University, Kampala, Uganda.

Herbarbeleg: A.B.K. 1.

Beschreibung: Lind et al. 1962

3.1.2.5 *Vernonia amygdalina* Delile, Asteraceae

Das Pflanzenmaterial (Blätter und Wurzeln) wurde in Kisaasi, 10 km nördlich von Kampala, Uganda von Frau Dr. B. Onegi gesammelt. Der Botaniker Herr A. B. Kakooko war für die Bestimmung und Identifizierung des Pflanzenmaterials zuständig. Ein Herbarbeleg wurde von ihm im Department of Pharmacy (Pharmacognosy Unit), Makerere University, Kampala, Uganda hinterlegt.

Herbarbeleg: A.B.K. 3.

Beschreibung: Watt et al. 1962

3.1.2.6 Hopfeninhaltsstoffe

Die von Herrn Professor Hänsel und Frau Schulz aus *Humulus lupulus* L., Cannabaceae isolierten Verbindungen (s. Abbildung 39) wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese Substanzen fanden Verwendung für das Testsystem des glutathionabhängigen Heminabbaus nach Steele (2002) und wurden bezüglich ihrer Fähigkeit, die Cystein-Protease Papain zu inhibieren, untersucht. Des Weiteren sind 5 dieser Hopfeninhaltsstoffe von Frau Elizabeth Hansell und Herrn J. H. McKerrow am Sandler Center for Basic Research in Parasitic Diseases, Department of Pathology, University of California, in San Francisco, USA an den Cystein-Proteasen Rhodesain (aus *Trypanosoma brucei rhodesiense*) und Cruzain (aus *Trypanosoma cruzi*) getestet worden, deren Ergebnisse in der Diskussion erörtert werden.

3.1.3 Phytochemisches Labor

3.1.3.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysenwaage BP 211D	Sartorius, Göttingen
Digitalkamera Canon Power Shot G5	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Einmal-Spritzenfilter GF/PET-Membran, 0,2 µm, 25 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Feinwaage CP 224S-OCE	Sartorius, Göttingen
Rotationsverdampfer Rotavapor R	Büchi AG, Schweiz
Rotilabo Spritzenfilter, PTFE-Membran, 0,2 µm, 13 mm	Carl Roth, Karlsruhe
UV-Lampe	Camag, Berlin
UV-Lampe CabUVIS- Desaga Sarstedt Gruppe	Desaga GmbH, Wiesloch
Ultraschallbad Sonorex RK 100 H	Bandelin Electronic, Berlin
Membran-Vakuumpumpe CVC2 für Rotationsverdampfer	Vaccubrand GmbH, Wertheim
Zentrifuge EBA 20	Hettich, Tuttlingen

3.1.3.2 Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller
Aceton	Neolab, Heidelberg
Anisaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Artemisinin	Carl Roth, Karlsruhe
Ameisensäure ≥ 98% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Butanol	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Brij 35	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chinin	Merck, Darmstadt
Chloroform	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Chloroquindiphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cyclohexan	Carl Roth, Karlsruhe
Dichlormethan	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) 97 %	Lancaster, England
Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure 100% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Ethylacetat	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar

Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37%, zur Synthese	Merck, Darmstadt
Glycerol 86%, zur Analyse	Ferak, Berlin
Glutathion 97%, reduziert	Lancaster, England
Hemin	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumjodid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumacetat, krist., zur Analyse	Merck, Darmstadt
Naturstoff-Reagenz A 98%, zur Analyse (Diphenylborsäure- β -aminoethylester)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumsulfat wasserfrei	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
N-Benzoyloxycarboxycarbonyl-(L)-phenylalanin-(L)-arginyl-7-amido-4-methylcumarin (= Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcumarin-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine guanidinobutylamid (E-64)	4- Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	LGC Promochem, Wesel
Papain from <i>Carica papaya</i> (Enzymaktivität 11,4 U/mg)	Fluka, Buchs, Schweiz
Phloretin	LGC Promochem GmbH, Wesel
Polyethylenglykol-4000	Carl Roth, Karlsruhe
Petrolether	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Phosphorsäure 85%	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Pufferlösung pH 6,88	Carl Roth, Karlsruhe
Pufferlösung pH 7,00	Carl Roth, Karlsruhe
Salicylsäure als Referenzsubstanz	Riedel de Haen, Seelze
Schwefelsäure 95-98%	Merck, Darmstadt
Vanillinsäure	Merck, Darmstadt
Weinsäure L (+)	Carl Roth, Karlsruhe
Wismut(III)-nitrat, basisch, zur Analyse	Merck, Darmstadt

Lösemittel

Zur Extraktion des Rohpflanzenmaterials wurden Lösemittel der Qualität „zur Analyse“ verwendet. Für die HPLC Anlage wurden ausschließlich HPLC-Qualität und bidestilliertes Wasser verwendet. Diese Ansprüche galten auch für die Säulenchromatographie (Kapitel 3.1.3.7.2).

3.1.3.3 Detektionsmittel

(nach Wagner et al. 1983 „Drogenanalyse“)

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (AS)

Spezifität: Ätherische Öle, Scharfstoffe, Bitterstoffe und Saponine

Herstellung und Anwendung: 0,5 mL Anisaldehyd werden mit 10 mL Eisessig, 85 mL Methanol und 5 mL konzentrierter Schwefelsäure in angegebener Reihenfolge gemischt. Das Reagenz ist nur begrenzt haltbar; bei Verfärbung nach rotviolett ist es nicht mehr verwendbar.

Die DC-Platte wird kräftig besprüht (ca. 10 mL) und 5-10 min bei 100°C im Trockenschrank erhitzt. Es wird im VIS bzw. im UV-365 nm ausgewertet.

Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG)

Spezifität: Flavonoid-Nachweis, Phenole

Herstellung und Anwendung: Auf die DC-Platte werden nacheinander eine 1%ige methanolische Lösung von Diphenylborsäure- β -aminoethylester nach NEU (= Diphenylboryloxyethylamin) und eine 5%ige ethanolische Polyethylenglykol-4000-Lösung (PEG) aufgesprüht (ca. 10 mL bzw. 8 mL).

Es entstehen sofort oder nach 15 min im UV bei 365 nm intensive Fluoreszenzfarben. Der Zusatz von PEG führt auch zu einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit.

Vanillin-Phosphorsäure Reagenz B (VPS)

Spezifität: Universalreagenz z.B. für Terpenoide, Lignane und Cucurbitacine

Herstellung und Anwendung: (Reagenz B) 2 Teile 24%ige Phosphorsäure-Lösung und 8 Teile einer 2%igen ethanolischen Vanillinsäure-Lösung werden gemischt. Nach dem Besprühen wird ca. 10 min bei 100°C erhitzt, die Auswertung erfolgt im VIS oder UV-365 nm.

3.1.3.4 Plattenfluorometrie/ -photometrie

Spectra Fluor

Tecan, Österreich

3.1.3.5 Massenspektrometrie

EI-MS

Varian MAT CH₇A, 70 eV

FAB-MS:

Varian MAT CH₅DF,
Matrix: DMSO/Glycerin, Xenon;
CHCl₃/slm-Nitrobenzylalkohol, Xenon
oder MeOH/Glycerin, Xenon

3.1.3.6 NMR-Spektroskopie

^1H NMR	Bruker DPX 400 (400 MHz)
	TMS als interner Standard
^{13}C NMR	Bruker DPX 400 (100,6 MHz)

3.1.3.7 Chromatographische Trennung

3.1.3.7.1 Dünnschichtchromatographie

Analytische DC	DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Schichtdicke 0,2 mm, 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt)
Präparative DC	DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Schichtdicke 0,2 mm, 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt)

3.1.3.7.2 Säulenchromatographie

Für die Trennung von Extrakten und einzelnen Fraktionen wurden entsprechend den vorhandenen Mengen Säulen unterschiedlicher Länge und Durchmesser verwendet, deren Dimensionen detailliert im Bereich „Phytochemische Untersuchungen traditioneller Heilpflanzen“ diskutiert werden.

Säulenmaterialien	Kieselgel 60 (70-230 mesh), Merck, Darmstadt LiChroprep RP-18 (Korngröße 0,040- 0,063 mm), Merck, Darmstadt Sephadex LH-20 (25-100 μm), Fluka Celite 545, Fluka
-------------------	--

3.1.3.7.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische HPLC

Stationäre Phase	Eurospher 100 C-18, 7 μm , 4 x 250 mm, Knauer, Berlin
HPLC-Gerät	Knauer HPLC Pump 64, Knauer, Berlin HPLC Programmer 50, barspec Chrom-A- Scope Detektor, barspec Chrom-A-Scope Software Package
MPLC	Pumpe: Modell Duramat; Chemie und Filter GmbH, Heidelberg

3.1.4 Zellkultur-Labor

3.1.4.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
CASY-Zellzählgerät, Casy Model DT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CO ₂ -Brutschrank Cellstar für Zellkultivierung	Nunc GmbH, Wiesbaden
Gas-Sicherheitsbrenner flammy S mit Fußtasterbetrieb	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Lichtmikroskop TMS-F	Nikon, Japan
Mikroplattenphotometer Tecan Spectra Fluor	Tecan, Österreich
Nikon Digital Still Camera DXM 1200	Nikon GmbH, Deutschland
Olympus BX 41 Mikroskop	Olympus Optical GmbH, Deutschland
Präzitherm Präzisions-Heizplatte	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
Rundschüttler, SLT Shaker	Elmech GmbH, Celle
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus Instruments, Berlin
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus-Christ, Hanau
Tischzentrifuge Medifuge 200 S	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Varioklav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem AZ 04	HLC-Biotech, Bovenden

3.1.4.2 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Produktbezeichnung	Hersteller
Casy Clean Lösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Casy Ton Lösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Deckgläschen (18 x 18 mm)	Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einmal- Injektionskanülen Gr. 1, Sterican	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Flüssigkeitsreservoirs steril (55 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Flüssigkeitsreservoirs unsteril (55 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gewebekulturflaschen (50 mL) steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (250 mL) steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kryoröhrchen (2 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Hämatoxylinlösung III nach Gill	Merck, Darmstadt
Medium 199 Earle (1x)	Biochrom KG; Berlin
(mit 2,2 g/L NaHCO ₃ und 0,177 g/L N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin)	
MEM-Earle (1x)	Biochrom KG, Berlin
(mit 2,2 g/L NaHCO ₃ und 0,516 g/L N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin)	

Mikrotiterplatte, schwarz, Kat.-Nr. 655076	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FLUOTRAC™ 200, math. Vol: 392 µL, F-Boden, unsteril, 96-Loch	
Polystyrol-Mikrotiterplatte mit	Neolab, Berlin
Abdeckplatte, 400µL, flat-bottom, unsteril, 96-Loch	
3-(4,5-Dimethylthiazplyl-2yl)-2,5- diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumpyruvat-Lösung	Biochrom KG, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)- Lösung	Biochrom KG, Berlin
Objektträger (76 x 26 mm)	Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Omnifix-Einmalspritzen (1 mL/ 2 mL/ 10 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
PBS-Dulbecco-Puffer (1x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , L 1825	Biochrom KG, Berlin
Poly-L-Lysin (Adhäsionsfaktor)	Biochrom KG, Berlin
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterilfilter Minisart, (Porengröße 0.2 µm)	Sartorius, Göttingen
Trypsin-EDTA-Lösung [0.05%/0.02%] (m/V) in PBS-Puffer ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom KG, Berlin
6-Loch-Zellkulturplatten (6 wells), steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
12-Loch-Zellkulturplatten (12 wells), steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Loch-Zellkulturplatten (96 wells), steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sterile Einmalartikel, wie Pipetten, Tips, Schraubdeckelröhrchen, etc. für die Zellkultivierung wurden von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Merck (Darmstadt) und Greiner (Nürtingen) bezogen.

3.1.4.3 Zelllinien

3.1.4.3.1 ECV-304 (DSMZ: ACC 310)

ECV-304 ist eine humane Harnblasenkarzinom-Zelllinie, die früher als menschliche Nabelschnur-Endothelzelllinie beschrieben wurde (Takahashi et al. 1990). DNA-Analysen beweisen die Verwandtschaft der T-24 Linie zu den von der DSMZ ausgegebenen ECV-304 Linien.

Morphologie: Es handelt sich um „adhärente“ Zelllinien, die als so genannte Monolayer im „Kopfsteinpflasterverbund“ wachsen. Sie bilden dichte, konfluente Zellverbände ohne erkennbare Lücken (Abbildung 5).

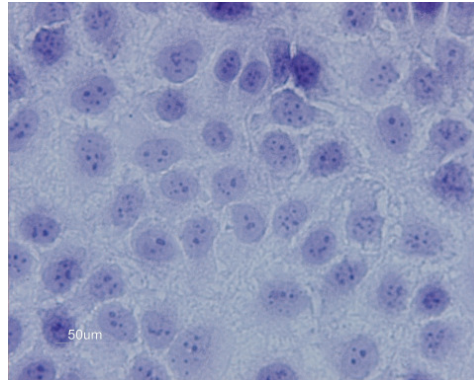


Abbildung 5 ECV-304 Zellen, Passage 30 (Einfärbung mit Hämatoxylin-Lsg. III nach Gill)

3.1.4.3.2 HepG2 (DSMZ: ACC 180)

HepG2 ist eine humane Leberkarzinom-Zelllinie mit einer mäßigen Ausdifferenzierung im Vergleich zu anderen hochdifferenzierten hepatozellulären Karzinomzelllinien. Morphologie: Es handelt sich um adhärent wachsende Zelllinien, die als Monolayer vorliegen (Abbildung 6).

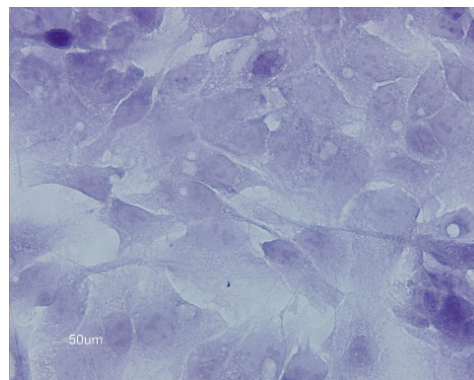


Abbildung 6 HepG2 Zellen, Passage 15 (Einfärbung mit Hämatoxylin-Lsg. III nach Gill)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellkultur erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 % igen CO₂/Luftgemisch. Sämtliche Experimente mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Kultivierung der ECV-304

Die Zellen wurden im Medium 199 Earle (mit 2,2 g/L NaHCO₃ und 0,177 g/L N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum bei 37°C und unter 5% CO₂-Atmosphäre als Monolayer kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte unter Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung 1x wöchentlich. Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS-Puffer gewaschen und mit 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Dieser Vorgang wurde durch kräftiges Schütteln der verschlossenen Zellkulturflasche beschleunigt. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 2 mL Kulturmedium pro Flasche gestoppt. Das Teilungsverhältnis betrug etwa 1:16.

Kultivierung der HepG2

Die Zellen wurden im MEM-Earle (mit 2,2 g/L NaHCO₃ und 0,516 g/L N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 1% nichtessentiellen Aminosäuren und 1% Natriumpyruvat bei 37°C und unter 5% CO₂-Atmosphäre als Monolayer kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte unter Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung 1x wöchentlich. Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS-Puffer gewaschen und mit 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Dieser Vorgang wurde durch kräftiges Schütteln der verschlossenen Zellkulturflasche beschleunigt. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 2 mL Kulturmedium pro Flasche gestoppt.

Das Teilungsverhältnis betrug etwa 1:6.

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zelllinien, mit denen nicht permanent gearbeitet wird, auf die aber bei Bedarf zurückgegriffen werden soll, können über längere Zeit bei sehr tiefen Temperaturen eingelagert werden. Die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C bewahrt die Zellen vor Kontamination und hält sie über Jahre lebensfähig. Dem Einfriermedium werden als Schutzsubstanzen Glycerol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Endkonzentration von 5-10 % beigemischt. Sie verhindern die Bildung von Wassereiskristallen sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas.

Materialien:

- Kryoröhrchen
- Flüssiger Stickstoff (Dewargefäß)

- Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C
- 15 mL Zentrifugenröhrchen
- Einfriermedium (steril): 80 % Kulturmedium auf 37°C temperiert + 10 % DMSO + 10 % fetales Kälberserum

Einfrieren von Zellen:

Nach dem Ablösen (Trypsinierung) der Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche durch Zugabe von Medium wird eine Zellsuspension hergestellt. Die suspendierten Zellen werden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen bei 1800 rpm in der Medifuge 200 S für 6 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in 10 mL Einfriermedium resuspendiert, danach in ein steriles Kryoröhrchen überführt (maximal 1,8 mL) und in einem geeigneten Behältnis in einer Tiefkühltruhe um 1°C/min abgekühlt. Die Kryoröhrchen können nach mehrstündiger Vorkühlung bei einer Temperatur von -80°C in die Behältnisse mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Auftauen von Zellen:

Die Kryoröhrchen werden schnell bei 37°C aufgetaut. Die Zellen werden sofort in 10 mL Kulturmedium (Zusatz von 15 % fetalem Kälberserum) aufgenommen und in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen bei 1800 rpm für 6 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird in Kulturmedium resuspendiert und in die Gewebekulturflaschen gesät. Nach 24 Stunden muss ein Wechsel des Kulturmediums erfolgen, um Reste von DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen.

3.2.1.3 Zellfixierung und Färbung für die Mikroskopie

Die humanen Karzinomzellen ECV-304 und HepG2 haften auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen. Zur Herstellung dieser Deckgläschen (DG) wurden sie zunächst in einer Mischung aus Methanol und konzentrierter Salzsäure (90:10) in einem Becherglas für 10-15 min. erhitzt, um sie damit von eventuellen Fettrückständen zu befreien und anschließend mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Aufbewahrung der DG erfolgte in einem mit Ethanol gefüllten, verschließbaren Gefäß.

Die genannten Zellen wurden wie gewohnt passagiert und die erhaltene Zellsuspension in 1 mL Medium aufgenommen. In jede Aussparung einer sterilen 6- Loch-Mikrotiterplatte wurde je ein steriles Deckgläschen gelegt. Die Oberfläche der Deckgläschen wurde für eine halbe Stunde mit 0,5 mL einer Poly-L-Lysin Lösung beschichtet und bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einer PBS Puffer-

Lösung gewaschen. Mit dieser Oberflächenbeschichtung kann ein besseres Zellwachstum erreicht werden. 5-10 μ L der Zellsuspension wurden auf ein Deckgläschen verteilt. Die abgedeckte Zellkulturplatte blieb für 2 h im Brutschrank, um den Zellen die Möglichkeit zur Adhärenz zu geben. Danach erfolgte die Zugabe von 2 mL Medium pro Well. Die Karzinomzelllinien wurden für 3-4 Tage im Brutschrank belassen. Nach dieser Wachstumsphase wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 mL einer 3% Formaldehyd-PBS Puffer-Lösung fixiert (1/2 h Einwirkzeit). Die Formaldehyd-Lösung wurde mit dem Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem AZ 04 entfernt und die Zellen wurden dreimal mit 2 mL bidestilliertem Wasser gewaschen. Die fixierten Zellen konnten anschließend mit 100-200 μ L einer Hämatoxylin-Farblösung für 30 Minuten eingefärbt werden. Die DG wurden sorgfältig mit bidestilliertem Wasser gewaschen, um überschüssiges Hämatoxylin zu entfernen. Ein Tropfen einer Glycerol-PBS-Lösung (1:1) wurde auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit der Zellseite auf den Tropfen gedrückt.

3.2.1.4 Herstellung der Extrakte für den Zytotoxizitätstest

Das von Frau Dr. Onegi und Herrn Kakooko identifizierte und luftgetrocknete Pflanzenmaterial wurde zu Pulver vermahlen.

Zur Extraktion wurden von jeder Droge 100 g Pulver mit 300 mL einer Mischung aus Petrolether und Ethylacetat im Verhältnis 1:1 für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Diese Prozedur wurde zwei Mal wiederholt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer bei 40°C entfernt. Das feuchte Drogenpulver wurde anschließend luftgetrocknet und dreimal mit Methanol nach der gleichen Methode extrahiert. Nach Evaporation des Lösemittels konnte der hydrophile Rückstand erhalten werden. Die Rohextrakte wurden auf Zytotoxizität an den Blasenkarzinomzellen ECV-304 und den Leberkarzinomzellen HepG2 untersucht.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstest an ECV-304- und HepG2- Karzinomzellen wurden mit bereits vorhandenen antiplasmodialen Daten (*P. falciparum*-Stämme: [PoW] und [Dd2]) kombiniert, um den Selektivitätsindex zu bestimmen.

3.2.1.5 *In vitro* Bestimmung der Zytotoxizität von Extrakten und Reinsubstanzen

Die Bestimmung der Zytotoxizität der Extrakte wurde an der ECV-304 (Passagen 12-39) und der HepG2 (Passagen 12-25) Zelllinie vorgenommen.

Die drei aus *E. mexicanum* isolierten Substanzen (**3**, **4** und **5**) wurden nur an der ECV-304 (Passage 39-45) Zelllinie getestet.

Die Durchführung des Testes erfolgte entsprechend der Literatur nach Freshney (1990). Zur Durchführung des MTT-Tests wurden für die ECV-304-Zelllinie ca. 1000 Zellen (Casy Model DT) pro Kavität auf einer sterilen 96-Loch-Zellkulturplatte in 100 μ L Medium 199 Earle unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum ausgesät und für 24 h im CO₂-Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Extrakte und Substanzen (in 100 μ L) dazugegeben. Nach 4 Tagen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden pro Kavität 20 μ L der MTT-Lösung (5 mg/mL PBS-Puffer) zugegeben, die Platte wurde 3 min mit Hilfe des Rundschüttler geschüttelt und für 2 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen. Anschließend wurden das Medium und die MTT-Lösung entfernt und pro Kavität 100 μ L DMSO zugegeben. Die Platte wurde nochmals für 15 min geschüttelt und die Absorption bei $\lambda = 580$ nm (Hintergrundwellenlänge: $\lambda = 620$ nm) im Plattenphotometer vermessen (5 sec. schütteln, orbital, middle, 8 Blitze).

Für die Durchführung des MTT-Testes mit den HepG2-Zelllinien wurden ca. 2000 Zellen (Casy Model DT) pro Kavität auf einer sterilen 96- well Mikrotiterplatte in 100 μ L Medium MEM-Earle unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 1% nichtessentiellen Aminosäuren und 1% Natriumpyruvat ausgesät und für 24 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie bei den ECV-304 Zellen.

3.2.1.6 Bestimmung des Selektivitätsindex

Der Selektivitätsindex (SI) ist definiert als Quotient aus Zytotoxizität und antiplasmodialer Aktivität (Likhitwitayawuid, 1993).

$$SI = \frac{IC_{50}\text{-Wert (Zytotoxizität ECV-304 oder HepG2)}}{IC_{50}\text{-Wert (}P. falciparum\text{)}}$$

3.2.2 Hemmung des glutathionabhängigen Heminabbaus

Mit dieser Methode sollte spektroskopisch der Effekt ermittelt werden, den die eingesetzten Substanzen auf die Inhibition des GSH vermittelten Heminabbaus haben.

Die Durchführung erfolgte in transparenten 96 well Polystyrol-Mikrotiterplatten (400 µL, flat-bottomed).

3.2.2.1 Herstellung der Stamm- und Arbeitslösungen

Stammlösungen

1 mM Diethyltriaminpentaessigsäure (DTPA) in 10 mM Na-phosphat pH 7,0;

2 mM Hemin in DMSO;

100 mM Glutathion (GSH), 1 mM DTPA in 10 mM Na-phosphat pH 6,8

Die Drogen- bzw. Wirkstoff-Stammlösungen (generell 2 mM) wurden in Puffer oder DMSO gelöst. Alle Stammlösungen wurden im gefrorenen Zustand gelagert, mit Ausnahme der Hemin-Lösung, die täglich frisch hergestellt werden musste.

Arbeitslösungen

A DTPA/Phosphat-Stammlösung 4 Volumenteile + 1 Volumenteil Ethanol

B 5µL Hemin Stammlösung zu 1 mL Lösung **A**

C 0,15 mL GSH Stammlösung zu 1 mL Lösung **A**.

3.2.2.2 Durchführung des Hemin-Multiwell-Assays

100 µL der Lösung **A** wurden in die Aussparungen der Mikrotiterplatten gegeben, gefolgt von der Drogen- (Wirkstoff-) oder Lösemittel-Kontrolle (z.B. 2 µL der 2 mM Drogen-Stammlösung).

Lösung **B** (Hemin) (200 µL) wurde mittels einer Acht-Kanalpipette in alle Aussparungen gegeben, mit der Lösung **C** (GSH) (50µL) wurde genauso verfahren.

Die endgültigen Drogen-(Wirkstoff-) sowie Heminkonzentrationen liegen bei 11 μM bzw. 5,7 μM .

Die Absorption wurde mit Hilfe des Mikrotiterplattenphotometers Tecan Spectra Fluor bei einer Wellenlänge von 360 nm (A_{360}) vermessen. Das Gerät wurde so eingestellt, dass die Absorption bei $t = 1$ min und $t = 30$ min gemessen wurde und anschließend wurden die ΔA_{360} berechnet. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (25°C), die Platten wurden vor der jeweiligen Messung 10 s orbital geschüttelt und die Blitzanzahl auf 8 festgelegt. Die Differenzen der Absorptionen bei $t = 1$ min und $t = 30$ min der Kontrollen und den Drogen- bzw. Wirkstoffen wurden bestimmt, der prozentuale Hemin-Abbau und die daraus resultierende Hemin-Hemmung berechnet.

Die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der vier Versuche (Hopfeninhaltsstoffe) bzw. der drei Versuche (*Momordica* Extrakte und Reinsubstanzen) wurden berechnet.

3.2.3 Inhibitorische Aktivität gegenüber Papain im Mikrotiterplattenmaßstab

3.2.3.1 Herstellung des Reaktionspuffers

Pufferlösung pH 5,5 R nach DAB 2001 NT

54,4 g Natriumacetat R wurden in 50 mL Wasser R gelöst und gegebenenfalls auf 35°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurden langsam 10 mL wasserfreie Essigsäure R zugesetzt. Nach dem Umschütteln wurde mit Wasser zu 100 mL verdünnt.

Der Pufferlösung pH 5,5 R nach DAB 2001 NT wurden folgende Substanzen hinzugefügt:

2,5 mM Dithiothreitol (DTT)

1,3 mM EDTA-di-Natrium

0,05 % Brij 35

3.2.3.2 Enzym-, Substrat-, Inhibitor- und Arbeitslösungen

Papain-Stammlösung: 0,3 mg/mL wurden in Reaktionspuffer pH 5,5 gelöst. Konzentration für den Assay: 200 ng/100 μL .

Zugabe: 100 μL /Well.

Substanzen bzw. Referenzsubstanzen: Stammlösungen: 2 mg/100 μL in DMSO; 32,5 μL Stammlösung zu 967,5 μL Reaktionspuffer pH 5,5;

Zugabe: 20 µL/Well.

E-64 (Inhibitor): Stammlösung: 1 mg/100 µL DMSO; 3,25 µL Stammlösung zu 996,75 µL Reaktionspuffer pH 5,5;

Zugabe: 20 µL/Well.

Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcumarin-HCL (Substrat): Stammlösung: 1,25 mM in Methanol.

Zugabe 10 µL/Well

Kontroll-Lösungen:

Kontroll-Lösung (1): Reaktionspuffer pH 5,5; davon 130 µL pro Well.

Kontroll-Lösung (2): 32,5 µL DMSO zu 967,5 µL Reaktionspuffer pH 5,5; davon 130 µL pro Aussparung. Sie dienen der Hintergrundmessung, um auszuschließen, dass DMSO störende Effekte verursacht.

3.2.3.3 Durchführung des Papain-Assays

Die Versuche wurden in schwarzen 96-Loch-Mikrotiterplatten (FLUOTRAC™ 200) bei 37°C durchgeführt. Bei den für Papain in der Literatur beschriebenen kinetischen Messmethoden wird entweder die Absorption einer durch Hydrolyse freigesetzten chromophoren Gruppe oder die Fluoreszenz von fluorogenen Gruppierungen des ursprünglichen Peptidsubstrates über einen festgelegten Zeitraum bei einer bestimmten Wellenlänge und Temperatur bestimmt.

Bei der gewählten kinetischen Fluoreszenzbestimmung wurde das Peptid-Substrat Z-Phe-Arg-AMC (N-Benzoyloxycarboxycarbonyl-(L)-Phenylalanin-(L)-Arginyl-7-Amido-4-methylcumarin) verwendet, bei dem unter Einwirkung der Cystein-Protease Papain die Peptidbindung Arg-AMC des Substrates hydrolysiert wird und anschließend die Fluoreszenz des freigesetzten Fluorogens 7-Amido-4-methylcumarin vermessen werden konnte. Der Anstieg der Fluoreszenzeinheiten pro festgelegte Zeiteinheit gilt als Maß für die Aktivität des Enzyms.

100 µL einer frisch hergestellten Papainlösung (200 ng/100 µL) in Reaktionspuffer wurden in die Aussparungen einer schwarzen 96-Loch-Mikrotiterplatte mit einer Achtkanalpipette gegeben und 5 Minuten bei 37°C im vorgewärmten Tecan Spectra Fluor vorinkubiert. Anschließend wurden 20 µL vom Inhibitor E-64 (5 µg/mL) und inhibitorische Substanzen bzw. Referenzsubstanzen (100 µg/mL) in Anwesenheit von Reaktionspuffer pH 5,5 in die jeweils dafür vorgesehenen Öffnungen mit der

Achtkanalpipette gegeben; Papainlösung und Inhibitor E-64 (oder Substanzen) wurden für weitere 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Diesem Ansatz wurden 10 µL Substrat (Z-Phe-Arg-7AMC; 1,25 mM) hinzugesetzt und die Fluoreszenz bei 37°C in 35 Zyklen alle 2 Minuten ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$) im Tecan Spectra Fluor vermessen. Eine Kontrollprobe wurde vorbereitet, bei der der Inhibitor durch den Reaktionspuffer ersetzt wurde, um die nicht inhibierte Papain-Aktivität zu bestimmen. In jeder Aussparung befanden sich insgesamt 130 µL.

Die Bedingungen für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegenüber Papain wurden nach einer Publikation von Saleh et al. 2003 übernommen, allerdings mussten bezüglich der Inkubationszeiten sowie der Substrat- und der Inhibitorkonzentrationen für den eigenen Mikrotiterplattenmaßstab Optimierungen vorgenommen werden.

Für die Ermittlung der optimalen Substratkonzentration wurden der vorinkubierten Enzymlösung (200 ng/100µL) jeweils 5 µL, 10 µL und 15 µL einer 2,5 mM, 1,25 mM bzw. 0,625 mM Substratlösung hinzugefügt. Es wurde ein Zeitraum von 70 Minuten (35 Zyklen alle 2 min.) gewählt, um den Zeitpunkt der Substratsättigung bestimmen zu können. Die Substratkonzentration von 1,25 mM erwies sich als optimal; es musste noch entschieden werden, wieviel µL an Substratlösung dem Enzym zugefügt werden sollten.

In der Abbildung 7 (Seite 39) sind die Steigungsgeraden der 1,25 mM konzentrierten Substratlösungen (Zugabe 5 µL, 10 µL und 15 µL) in dem Zeitraum von 2 min bis 12 min dargestellt. Für weitere Versuche erwies sich eine Substratzugabe von 10 µL (rosafarbene Steigungsgerade, Abbildung 7) als optimal. Der Regressionskoeffizient betrug $R^2 = 0,9929$. Die Wahl fiel auf die sich im Mittelfeld befindende Konzentration, da der Regressionskoeffizient von 15 µL ($R^2 = 0,9891$) sich als schlechter erwies und die Steigungsgerade von 5 µL ($R^2 = 0,9993$) zu flach war, um bei weiteren Versuchen eine bestmögliche Auswertung zu erhalten.

Als optimal wurde eine Spaltgröße von Gain = 25 angesehen, da die voreingestellte Gainzahl von 60 Fluoreszenzeinheiten hervorbrachte, die nicht mehr auswertbar waren.

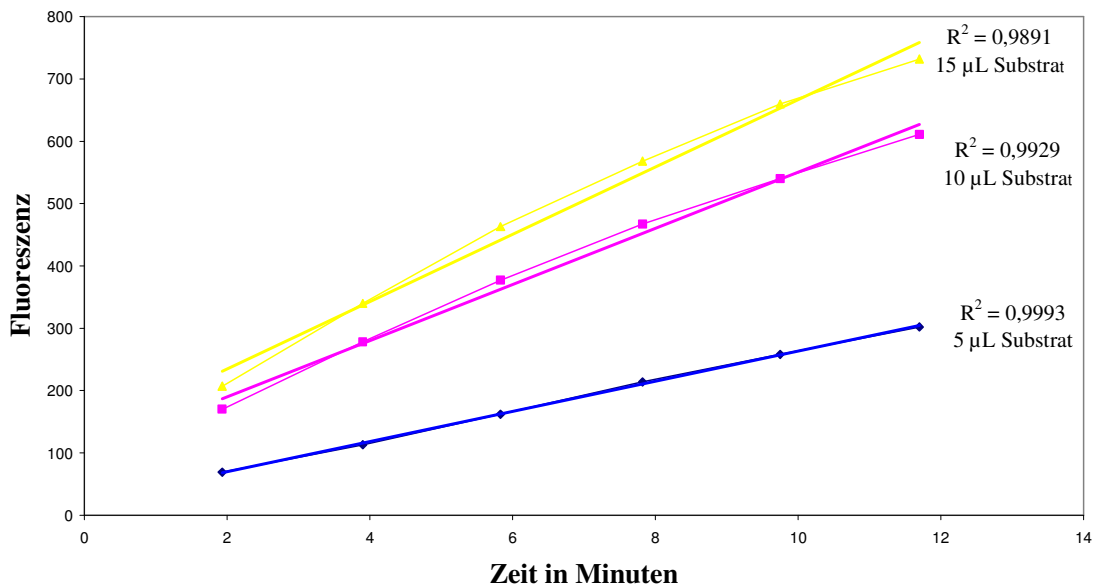


Abbildung 7 Darstellung der Steigungsgeraden bei konstanter Papainkonzentration (200 ng/100 µL) und verschiedenen Substratmengen Zugaben von 5 µL (blau), 10 µL (rosa) und 15 µL (gelb) einer 1,25 mM Z-Phe-Arg-AMC-Lösung

Für die Suche nach der optimalen Inhibitorkonzentration (E-64) wurden zwei Stammlösungen (2 mg/100 µL und 1 mg/100 µL) hergestellt. Die Stammlösung wurde mit Reaktionspuffer verdünnt, so dass die Zugabe von 20 µL Inhibitorlösung Konzentrationen von 100 µg/mL und 10 µg/mL bzw. 5 µg/mL und 0,5 µg/mL entsprachen. Die Konzentration von 5 µg/mL erwies sich als optimal für den Versuchsansatz. Bei dem Inhibitor E-64 handelt es sich um einen irreversiblen Enzymhemmer, der seine Wirkung schon in geringsten Konzentrationen zeigt.

Zur Kontrolle wurde die Fluoreszenz von allen Untersuchungslösungen ohne Substrat- und Enzymlösung über den Zeitraum der Messung ermittelt und als Grundfluoreszenz vom eigentlichen Messwert abgezogen. Wenn als Lösungsmittel ein anderes als Puffer verwendet wurde, musste eine entsprechende Kontrolle mitgeführt werden, um sicherzustellen, dass man dadurch die Aktivität des Enzyms nicht nachteilig beeinflusst.

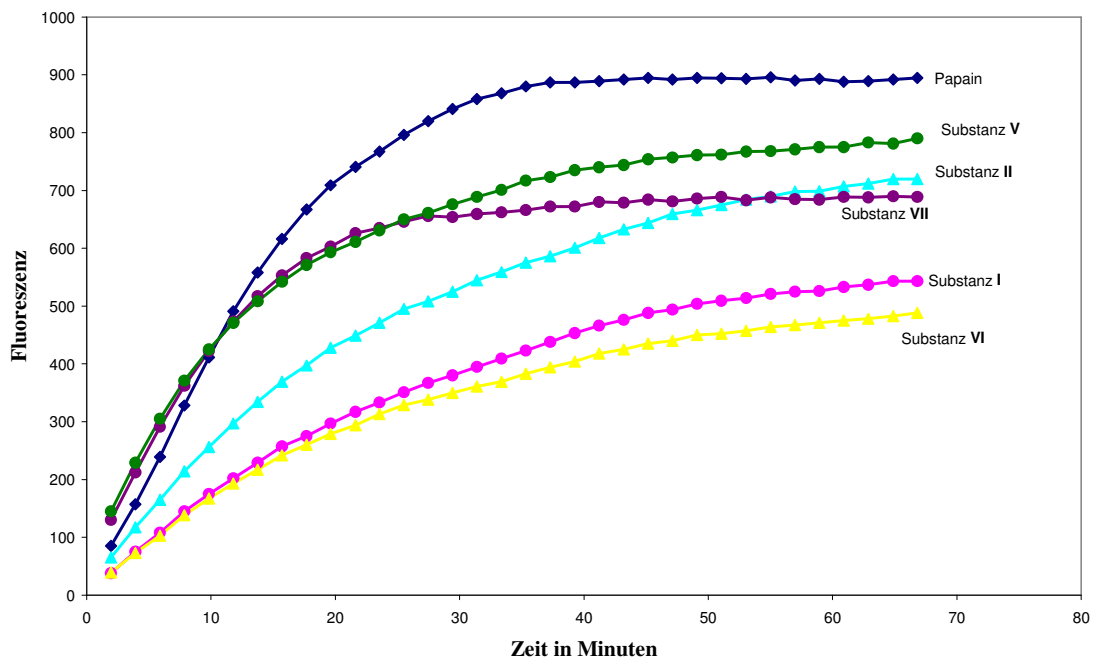


Abbildung 8 Darstellung der Kurvenverläufe der einzelnen Hopfeninhaltsstoffe I, II, V, VI, VII und des Papains (200 ng/100 μ L) der kinetischen Messung

Die kinetische Messung wurde über einen Zeitraum von 70 Minuten durchgeführt, um deutlich den Bereich der Substratsättigung feststellen zu können (Abbildung 8). Um die prozentuale Enzymhemmung bestimmen zu können, wurde der Zeitraum von $t = 2$ min bis 12 min für alle untersuchten Substanzen und das nicht inhibierte Papain ausgewählt. Durch die gewählten 6 Meßpunkte konnte eine Ausgleichsgerade gelegt werden und die Steigung bestimmt werden. Mit Hilfe der Steigungsgleichungen wurde die Enzymaktivität bzw. die Enzymhemmung bestimmt.

Als Testsubstanzen wurden die Hopfensubstanzen I, II, V, VI und VII überprüft sowie das käuflich erworbene Chalkon Phloretin und Chloroquindiphosphat. Die genannten Hopfeninhaltsstoffe wurden in San Francisco an der Universität von Kalifornien von Frau Elizabeth Hansell im McKerrow Labor des Sandler Centers (Tropical Disease Research Unit) auf ihre Aktivität gegenüber Cruzain und Rhodesain überprüft (Kapitel 4.8).

3.2.4 Phytochemische Untersuchungen traditioneller Heilpflanzen

3.2.4.1 Extraktion und Untersuchung von *Exostema mexicanum*

Die an der Luft getrockneten und zerkleinerten **Blätter** (300 g) von *E. mexicanum* A.Gray wurden dreimal mit je 1,0 L Methanol für 12 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Evaporation am Rotationsverdampfer (40°C, Wasserbad) wurde der Extrakt (48,5 g) mit 0,25 L einer 2% igen (m/V) Weinsäure-Lösung angesäuert. Der wässrige Auszug wurde mit Petrolether (3x 0,25 L), Dichlormethan (3x 0,25 L), Ethylacetat (3x 0,25 L) und Butanol (3x 0,25 L) extrahiert. Die jeweils vereinigten und über Natriumsulfat getrockneten Phasen wurden im Vakuum zur Trockne einrotiert.

Petrolether-Rohextrakt:	4,63 g
Dichlormethan-Rohextrakt:	2,12 g
Ethylacetat-Rohextrakt:	1,71 g
Butanol-Rohextrakt	2,61 g

Der evaporierte Butanol-Extrakt (2,61 g) wurde in 4 mL Methanol gelöst und über eine offene und mit Sephadex LH 20 (80 g) gefüllte Glassäule (2,5 cm x 64 cm) gegeben. Die aufgebene Extraktlösung wurde mit 500 mL Methanol bei einer konstanten Tropfgeschwindigkeit von 2,5 mL/min in 200 Fraktionen getrennt. Die vereinigten Fraktionen 166-200 wurden mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt. Das geeignete Fließmittel bestand aus den Komponenten Ameisensäure, Wasser und Ethylacetat im Verhältnis 9:9:82. Diese chromatographische Trennung wurde in einer Glaskammer mit Kammersättigung durchgeführt. Zur Durchführung der präparativen Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) verwendet. Die Laufstrecke für diese Isolierung wurde auf 13 cm festgelegt und die Anzahl der Platten betrug insgesamt 6 Stück, jede Platte wurde zur besseren Trennung zweimal entwickelt. Die Platten wurden nach der Entwicklung luftgetrocknet und um den Ameisensäuregeruch etwas zu reduzieren, wurden sie vorsichtig mit einem Fön nachgetrocknet. Unter der UV-Lampe wurden Fluoreszenzminderungen bei 254 nm markiert und anschließend 2 cm Abschnitte dieser Platten mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) fein besprüht sowie luftgetrocknet. Im UV-Licht bei 365 nm waren intensive Fluoreszenzfarben zu erkennen. Die R_F-Werte wurden anhand der DC-Plattenabschnitte ermittelt und die Kieselgelschicht an der markierten, unbesprühten Stelle mit einem Spatel

herausgekratzt. Das mit der jeweiligen Substanz erhaltenen Kieselgelpulver wurde mit einem geeigneten Lösemittel (Aceton) extrahiert, zentrifugiert, der Überstand in einen Rundkolben (50 mL) überführt und abrotiert. Mit Hilfe dieser Methode konnten die zwei 4-Phenylcumaringlykoside 5-*O*- β -D-Glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcumarin (**1**) ($R_f = 0,49$; 35,2 mg) und 5-*O*- β -D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**4**) ($R_f = 0,35$; 7,9 mg) isoliert werden.

Der evaporierte Ethylacetat-Extrakt (1,71 g) wurde mit 2 g Celite 545 aufgenommen und auf eine mit LiChroprep RP-18 Material gefüllte Chromatographiesäule (2,5 cm x 32 cm) gegeben. Der mit Celite aufgegebene Extrakt wurde mit einem Wasser-Methanol Gemisch, beginnend mit einem Verhältnis von 90:10 (V/V) und endend mit reinem Methanol bei einer konstanten Tropfgeschwindigkeit von 4 mL/min in 16 Fraktionen getrennt (Tabelle 3).

Tabelle 3 Fraktionierungsschema des Ethylacetat-Extraktes (1,71g) von *E. mexicanum*

Fraktionen	Wasseranteil in %	Methanolanteil in %	Menge an Elutionsmittel in mL
A1	90	10	50
A2	90	10	50
A3	90	10	50
B1	80	20	50
B2	80	20	50
C1	70	30	40
C2	70	30	60
D1	60	40	50
D2	60	40	50
E1	50	50	50
E2	50	50	50
F1	30	70	50
F2	30	70	50
G1		100	150
G2		100	150
G3		100	100

Fraktion D2 (96,3 mg) (H₂O-MeOH 60:40) ergab 5-*O*- β -D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**4**) mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (HCO₂H-H₂O-EtOAc 9:9:82, $R_f = 0,35$; 8,3 mg), aus Fraktion E1 (114,8 mg) (H₂O-MeOH 50:50) wurden 5-*O*- β -D-Glucopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**2**) ($R_f = 0,56$; 6,3 mg), 5-*O*- β -D-

Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**3**) ($R_f = 0,47$; 5,5 mg) und Kämpferol-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-(4-cumaroyl- β -D-galactopyranosyl)-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**7**) ($R_f = 0,11$, 4 mg) isoliert. Die Fraktion F1 (70,3 mg) (H₂O-MeOH 30:70) ergab Kämpferol-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[2,4-diacetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-(4-cumaroyl- β -D-galactopyranosyl)-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**6**) ($R_f = 0,37$, 8 mg).

Der evaporierte Dichlormethan-Extrakt (2,12 g) wurde mit 5 g Celite 545 aufgenommen und auf eine mit Kieselgel 60 (20 g) gefüllte Chromatographiesäule (2,5 cm x 32 cm), die an ein Pumpsystem (Modell Duramat) angeschlossen war, gegeben. Der auf Celite gezogene Dichlormethan-Extrakt wurde sequentiell mit einem Dichlormethan-Methanol-Gemisch in 46 Fraktionen getrennt. Die Fraktionen 1-15 wurden mit 200 mL eines Dichlormethan-Methanol-Gemisches (99:1 V/V), die Fraktionen 16-28 mit 400 mL eines Dichlormethan-Methanol-Gemisches (98:2 V/V), die Fraktionen 29-39 mit 100 mL eines Dichlormethan-Methanol-Gemisches (95:5 V/V) und die restlichen 7 Fraktionen mit reinem Methanol eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit von 4 mL/min wurde konstant beibehalten. Die erhaltenen Fraktionen 25 und 26 (CH₂Cl₂-MeOH 98:2 (V/V)) wurden nach einer Kontroll-Dünnschichtchromatographie vereint.

Dieser fraktionierte Extrakt (230 mg) wurde in 1 g Celite 545 aufgenommen und auf eine mit LiChroprep RP-18 Material gefüllte Chromatographiesäule (2,5 cm x 32 cm), die an ein Pumpsystem (Modell Duramat) angeschlossen war, gegeben.

Die Trennung erfolgte sequentiell mit einem Wasser-Methanol-Gemisch, beginnend mit 200 mL (80:20 V/V), weiterführend mit 100 mL (70:30 V/V), 100 mL (60:40 V/V), 100 mL (50:50 V/V), 100 mL (30:70 V/V) und endend mit 200 mL reinem Methanol bei einer konstanten Tropfgeschwindigkeit von 3 mL/min in 16 Fraktionen (inklusive 50 mL Vorlauf) getrennt (Tabelle 4).

Tabelle 4 Fraktionierungsschema der vereinten Fraktionen 25 und 26 von *E. mexicanum* (230 mg, CH₂Cl₂-MeOH 98:2 (V/V))

Fraktionen	Wasseranteil in %	Methanolanteil in %	Menge an Elutionsmittel in mL
Vorlauf	80	20	50
1a-1c	80	20	150
2a-2b	70	30	100
3a-3b	60	40	100
4a-4b	50	50	100
5a-5b	30	70	100
6a-6d		100	200

Die erhaltene Fraktion 1b ergab nach struktureller Aufklärung das häufig in der Pflanzenwelt vorkommende Cumarinderivat Scopoletin (**8**) (80:20 V/V), in der Fraktion 3a ließ sich das Carotinabbauprodukt Loliolid (**9**) (60:40 V/V) nachweisen. Aus diesem lipophilen Dichlormethan-Extrakt wurde aus den vereinigten Fraktionen 5a und 5b das 4-Phenylcumarinaglykon 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**) ((30:70 V/V), 12 mg) gewonnen.

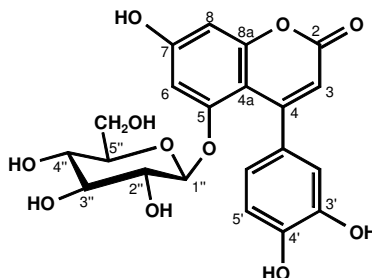
Der evaporierte Petrolether-Extrakt (4,63 g) wurde mit 4 g Celite 545 aufgenommen und auf eine mit LiChroprep RP-18 Material (27 g) gefüllte Chromatographiesäule (2,5 cm x 32 cm), die an ein Pumpsystem (Modell Duramat) angeschlossen war, gegeben. Die Trennung erfolgte sequentiell mit einem Wasser-Methanol Gemisch, beginnend mit 150 mL im Verhältnis 70:30 (V/V), weiterführend mit 100 mL im Verhältnis 60:40 (V/V), weiteren 100 mL (50:50 V/V), 200 mL (20:80 V/V) und endend mit 350 mL reinem Methanol bei einer konstanten Tropfgeschwindigkeit von 3 mL/min in 13 Fraktionen (inklusive 50 mL Vorlauf) (Tabelle 5).

Tabelle 5 Fraktionierungsschema des Petrolether-Extraktes (4,63 g) von *E. mexicanum*

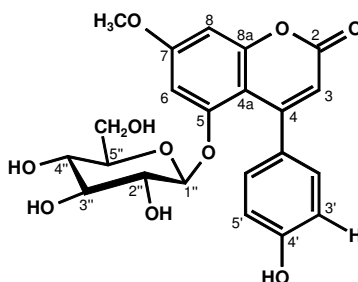
Fraktionen	Wasseranteil in %	Methanolanteil in %	Menge an Elutionsmittel in mL
Vorlauf	70	30	50
Ia	70	30	50
Ib	70	30	50
IIa	60	40	50
IIb	60	40	50
IIIa	50	50	50
IIIb	50	50	50
IVa	20	80	50
IVb	20	80	50
IVc	20	80	50
IVd	20	80	50
V		100	200
VI		100	150

Die Fraktion Ia (56,6 mg) wurde in 500 μ L Methanol (HPLC-Qualität) aufgenommen und mit der analytischen HPLC bei einer Wellenlänge von $\lambda = 225$ nm in einzelne Komponenten aufgetrennt. Zur Auftrennung wurde ein Fließmittelgemisch aus Wasser und Methanol ohne Phosphorsäurezusatz bei einer konstanten Flußrate von 1,5 mL/min (70:30 H₂O-MeOH, nach 20 Minuten 30:70 H₂O-MeOH und nach 30 Minuten 1:99) verwendet. Insgesamt wurden mit dieser Methode 4 Peaks erhalten, jedoch erwies sich nur der Peak 3 ($R_t = 670$ sec, H₂O-MeOH-Verhältnis: 48:52) als brauchbare Verbindung und konnte strukturell als Salicylsäure (**10**) identifiziert werden.

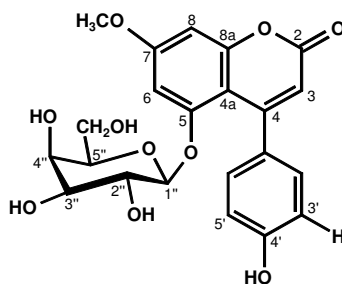
3.2.4.1.1 Charakterisierung der 4-Phenylcumaringlykoside (1-4) aus *E. mexicanum*
 5-O- β -D-Glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcumarin [1]



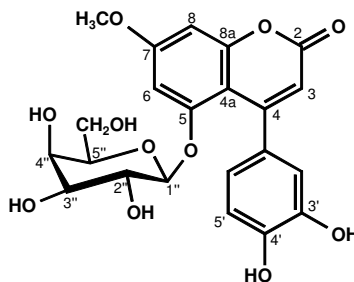
Menge:	35,2 mg
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _f -Wert: 0,49 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
(-)-FAB-MS, m/z :	447 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ_{H} (ppm):	2,73 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H-2''); 3,30-3,75 (3H, <i>m</i> , H-3'', H-4'', H-5''); 3,69 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,0 Hz, <i>J</i> = 10,0 Hz, H-6''b); 3,86 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 10,1 Hz, H-6''b); 4,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,69 Hz, H-1''); 5,87 (1H, <i>s</i> , H- 3); 6,46 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz, H-8); 6,54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz, H-6); 6,72 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 8,1 Hz, H-6'); 6,81 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz, H-5'); 6,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,8 Hz, H-2')
¹³ C NMR (100,6 MHz, Methanol-d ₄), δ_{C} (ppm):	163,5 (C-2); 112,3 (C-3); 158,4 (C-4); 104,4 (C-4a); 158,2 (C-5); 98,3 (C-6); 163,2 (C-7); 100,4 (C-8); 157,4 (C-8a); 132,9 (C1'); 116,0 (C-2'); 145,5 (C-3'); 147,0 (C-4'); 115,6 (C-5'); n. b. (C-6'); 101,3 (C-1''); 74,6 (C-2''); 78,2 (C-3''); 71,0 (C-4''); 77,7 (C-5''); 62,3 (C-6'')

5-O- β -D-Glucopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin [2]

Menge:	6,3 mg
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _F -Wert: 0,56 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀
(-)-FAB-MS, m/z:	445 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ_{H} (ppm):	2,68 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,0$ Hz, $J = 9,5$ Hz, H-2''); 3,45-3,65 (3H, <i>m</i> , H-3'', H-4'', H-5''); 3,50 (1H, <i>dd</i> , $J = 7,0$ Hz, $J = 11,0$ Hz, H-6''a); 3,58 (1H, <i>dd</i> , $J = 5,0$ Hz, $J = 11,0$ Hz, H- 6''b); 3,88 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -7); 4,83 (1H, <i>d</i> , $J =$ 7,5 Hz, H-1''); 5,93 (1H, <i>s</i> , H-3); 6,67 (2H, <i>s</i> , H-6, H-8); 6,83 (2H, <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, H-3', H-5'); 7,22 (2H, <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, H-2', H-6')
¹³ C NMR (100,6 MHz, Methanol-d ₄), δ_{C} (ppm):	160,4 (C-2); 113,3 (C-3); 158,1 (C-4); 104,4 (C-4a); 156,2 (C-5); 99,8 (C-6); 163,4 (C-7); 96,6 (C-8); 156,6 (C-8a); 132,3 (C-1'); 127,3 (C-2'); 115,5 (C-3'); 157,6 (C-4'); 115,5 (C-5'); 127,3 (C-6'); 56,5 (OCH ₃ -7); 101,5 (C-1''); 74,5 (C-2''); 78,4 (C-3''); 71,2 (C-4''); 77,8 (C-5''); 62,6 (C-6'')

5-O- β -D-Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin [3]

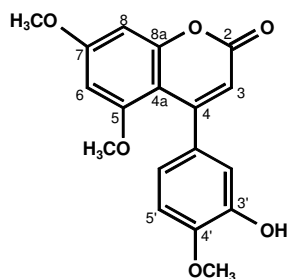
Menge:	5,5 mg
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _F -Wert: 0,47 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀
(-)-FAB-MS, m/z:	445 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ_{H} (ppm):	3,09 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 7,7 Hz, 9,6 Hz, H-2''); 3,40-3,75 (4H, <i>m</i> , H-3'', H-5'', H-6''a, H-6''b); 3,79 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz, H-4''); 3,88 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -7); 4,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,7 Hz, H-1''); 5,93 (1H, <i>s</i> , H-3); 6,66 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz, H-8); 6,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz, H-6); 6,85 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,6 Hz, H-3', H-5'); 7,24 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,6 Hz, H-2', H-6')

5-O- β -D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin [4]

Menge:	7,9 mg (Butanolextrakt) + 8,3 mg (EtOAc-Extrakt)
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _F -Wert: 0,35 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
(+)-FAB-MS, m/z:	485 [M+Na] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	461 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ_{H} (ppm):	3,14 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 7,8 Hz, <i>J</i> = 9,5 Hz, H-2''); 3,30 (1H, unter Methanol, H-5''); 3,43 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz, <i>J</i> = 9,7 Hz, H-3''); 3,65 (1H, <i>br d</i> , <i>J</i> = 11,0 Hz, H-6''b); 3,73 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,5 Hz, <i>J</i> = 11,8 Hz, H-6''a); 3,81 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz, H-4''); 3,88 (1H, <i>s</i> , OCH ₃ -7); 4,77 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,7 Hz, H-1''); 5,94 (1H, <i>s</i> , H-3); 6,66 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz, H-8); 6,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz, H-6); 6,74 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz, <i>J</i> = 8,0 Hz, H-6'); 6,84 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1 Hz, H- 5'); 6,86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-2')

3.2.4.1.2 Charakterisierung des 4-Phenylcumarins (5) aus *E. mexicanum*

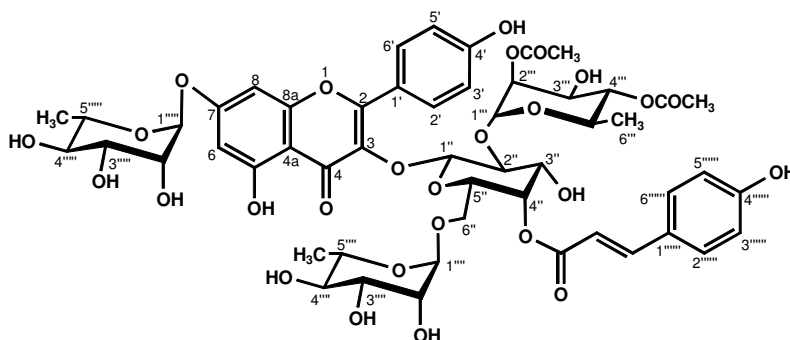
3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin [5]



Menge:	12 mg
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	CHCl ₃ /MeOH (3:1 [V/V]); R _f -Wert: 0,9
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₆ O ₆
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	328 [M] ⁺ (46); 300 (33); 285 (13)
¹ H NMR (400 MHz, Aceton-d ₆), δ _H (ppm):	3,55 (3H, s, OCH ₃ -5); 3,90 (3H, s, OCH ₃ - 4'); 3,93 (3H, s, OCH ₃ -7); 5,86 (1H, s, H-3); 6,42 (1H, d, J = 2,3 Hz, H-6); 6,56 (1H, d, J = 2,3 Hz, H-8); 6,78 (1H, dd, J = 8,2 Hz, 2,1 Hz, H-6'); 6,82 (1H, d, J = 2,1 Hz, H-2') 6,97 (1H, d, J = 8,2 Hz, H-5')

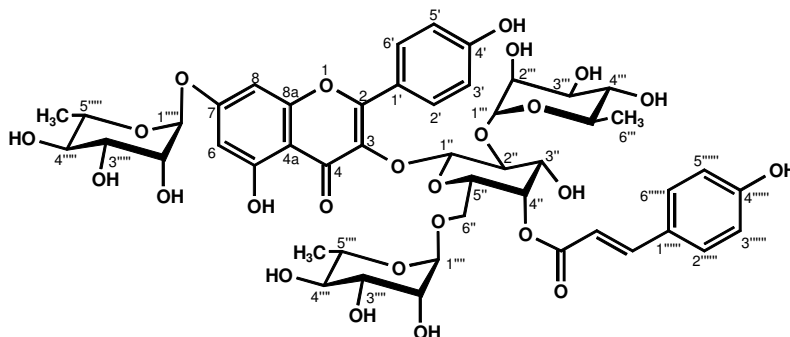
3.2.4.1.3 Charakterisierung der Flavonoidglykoside (6-7) aus *E. mexicanum*

Kämpferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[2,4 diacetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-(4-cumaroyl- β -D-galactopyranosyl)-7-O- α -L-rhamnopyranosid [6]



Menge:	8 mg
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _f -Wert: 0,37 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₅₂ H ₆₀ O ₂₇
(-)-FAB-MS, m/z:	1115 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ _H (ppm):	siehe Tabelle 9
¹³ C NMR (100,6 MHz, Methanol-d ₄), δ _C (ppm):	siehe Tabelle 9

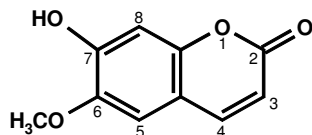
Kämpferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-(4-cumaroyl- β -D-galactopyranosyl)-7-O- α -L-rhamnopyranosid [7]



Menge:	4 mg
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _F -Wert: 0,11 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb-orange
Summenformel:	C ₄₈ H ₅₆ O ₂₅
(-)-FAB-MS, m/z:	1031 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ _H (ppm):	1,02 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz, H-6'''); 1,03 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz, H-6'''); 1,26 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz, H-6'''); 4,46 (1H, <i>br s</i> , H-1'''); 5,20 (1H, <i>br s</i> , H-1'''); 5,34 (1H, <i>br s</i> , H-4''); 5,56 (1H, <i>br s</i> , H-1'''); 5,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz, H-1''); 6,34 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16,0 Hz, H-8'''); 6,47 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-6); 6,75 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-8); 6,84 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz, H- 3'''), H-5'''); 6,96 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz, H-3', H-5'); 7,49 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz, H- 2'''), H-6'''); 7,63 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16,0 Hz, H-7'''); 8,16 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz, H-2', H- 6')

3.2.4.1.4 Charakterisierung von Scopoletin (8) aus *E. mexicanum*

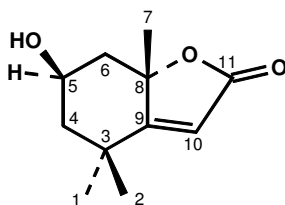
Scopoletin [8]



Menge:	4 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]); R _f -Wert: 0,3
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); hellblaue Fluoreszenz bei 254 nm und 365 nm
Summenformel:	C ₁₀ H ₈ O ₄
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	192 [M] ⁺ (78); 177 (45); 164 (17); 149 (30)
¹ H NMR (400 MHz, Aceton-d ₆), δ _H (ppm):	3,90 (3H, s, OCH ₃ -6); 6,16 (1H, d, J = 9,4 Hz, H-3); 6,80 (1H, s, H-5); 7,19 (1H, s, H- 8); 7,84 (1H, d, J = 9,4 Hz, H-4)

3.2.4.1.5 Charakterisierung von Loliolid (9) aus *E. mexicanum*

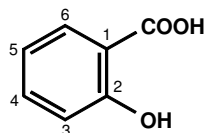
Loliolid [9]



Menge:	3 mg
Eigenschaften:	gelbliches Öl
Chromatographische Parameter:	CHCl ₃ /MeOH (4:1 [V/V]); R _f -Wert: 0,6
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm)
Summenformel:	C ₁₁ H ₁₆ O ₃
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	196 [M] ⁺ (6); 178 (15); 163 (7); 153 (6); 140 (13); 111 (33)
¹ H NMR (400 MHz, Chloroform-d ₁), δ _H (ppm):	1,27 (3H, s, Me-2); 1,47 (3H, s, Me-1); 1,53 (1H, dd, J = 3,5 Hz, J = 14,0 Hz, H-4ax); 1,78 (1H, dd, J = 3,5 Hz, J = 14,0 Hz, H- 6ax); 1,79 (3H, s, Me-7); 1,98 (1H, dt, J = 3,0 Hz, J = 15,0 Hz, H-4eq); 2,46 (1H, dt, J = 3,0 Hz, J = 15,0 Hz, H-6eq); 4,33 (1H, quint, J = 3,0 Hz, H-5eq); 5,69 (1H, s, H-10)

3.2.4.1.6 Charakterisierung von 2-Hydroxybenzoesäure (10) aus *E. mexicanum*

2-Hydroxybenzoesäure (Salicylsäure) [10]



Menge:	3 mg
Eigenschaften:	weißer Feststoff
Chromatographische Parameter:	Cyclohexan/EtOAc (1:1 [V/V]); R _f -Wert: 0,06
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm)
Summenformel:	C ₇ H ₆ O ₃
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	138 [M] ⁺ (57), 120 [M-H ₂ O] (100), 92 (42), 64 (17), 39 (18)
¹ H NMR (400 MHz, Chloroform-d ₁), δ _H (ppm):	6,90 (1H, dt, J = 0,5 Hz, J = 8,0 Hz, H-4/H-5), 7,00 (1H, dd, J = 0,5 Hz, J = 8,0 Hz, H-3), 7,48 (1H, dt, J = 0,5 Hz, J = 8,0 Hz, H-4/H-5), 7,90 (1H, dd, J = 0,5 Hz, J = 8,0 Hz, H-6), 10,53 (1H, br s, -COOH)

3.2.4.2 Extraktion und Untersuchung von *Stachytarpheta guatemalensis*

Die an der Luft getrocknete und zerkleinerte Ganzpflanze (430 g) von *S. guatemalensis* Moldenke wurden dreimal mit je 2 L Methanol für 12 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Evaporation am Rotationsverdampfer (40°C, Wasserbad) wurde der Extrakt (42 g) mit 0,40 L einer 2% igen (m/V) Weinsäure-Lösung angesäuert. Der wässrige Auszug wurde mit Petrolether (3x 0,40 L), Dichlormethan (3x 0,40 L) und Ethylacetat (3x 0,40 L) extrahiert. Die jeweils vereinigten und über Natriumsulfat getrockneten Phasen wurden im Vakuum zur Trockne einrotiert.

Petrolether-Rohextrakt:	1,99 g
Dichlormethan-Rohextrakt:	1,27 g
Ethylacetat-Rohextrakt:	3,16 g

Von dem mit einem Einmal-Spritzenfilter filtrierten Ethylacetat-Rohextrakt wurden 20 µL injiziert. Der Extrakt wurde mittels der analytischen HPLC mit den Fließmittelkomponenten Wasser und Methanol im Verhältnis 70:30, nach 20 Minuten 30:70 und nach 30 Minuten 1:99 unter Zusatz von 0,5 % Phosphorsäure bei einer Flußrate von 1,5 mL/min und einer Wellenlänge von 225 nm detektiert. Bei einer

Retentionszeit von 422 und 564 Sekunden zeigten sich im Chromatogramm zwei intensive Peaks, die isoliert werden sollten.

Dazu wurde der in Methanol gelöste Ethylacetat-Extrakt (Seite 54) bandförmig auf eine zugeschnittene Aluminiumfolie (Kieselgel 60 F₂₅₄, 5 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) aufgetragen und mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus den Komponenten Ameisensäure, Wasser und Ethylacetat im Verhältnis 9:9:82 mit Kammersättigung entwickelt. Die Platten wurden nach der Entwicklung luftgetrocknet und vorsichtig mit einem Fön nachgetrocknet. Unter der UV-Lampe erschienen bei 254 nm zwei intensive Fluoreszenzminderungen, die mit feinen Bleistiftstrichen markiert und mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) besprüht wurden. Im UV-Licht bei 365 nm waren intensive Fluoreszenzfarben bei R_f-Werten von 0,56 (gelb-orange) und 0,63 (grün-gelb) zu erkennen. Von dem Ethylacetat-Rohextrakt wurden 0,5 g in 1,5 mL Methanol gelöst und mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt. Das geeignete Fließmittel bestand aus den Komponenten Ameisensäure, Wasser und Ethylacetat im Verhältnis 9:9:82. Diese chromatographische Trennung wurde in einer Glaskammer mit Kammersättigung durchgeführt. Zur Durchführung der präparativen Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) verwendet. Die Laufstrecke für diese Isolierung wurde auf 10 cm festgelegt, jede der 4 Platten wurde zur besseren Trennung zweimal entwickelt. Die Platten wurden nach der Entwicklung vorerst luftgetrocknet und anschließend mit einem Fön nachgetrocknet. Unter der UV-Lampe wurden Fluoreszenzminderungen bei 254 nm markiert und anschließend 2 cm Abschnitte dieser Platten mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) fein besprüht sowie luftgetrocknet. Im UV-Licht bei 365 nm zeigten sich die im Vorversuch erschienenen intensiven Fluoreszenzfarben. Die R_f-Werte wurden anhand der DC-Plattenabschnitte ermittelt und die Kieselgelschicht an der markierten Stelle mit einem Spatel herausgekratzt. Das mit der jeweiligen Substanz erhaltenen Kieselgelpulver wurde mit einem geeigneten Lösemittel (Aceton) extrahiert, zentrifugiert, der Überstand in einen Rundkolben überführt und abrotiert. Mit Hilfe dieser Methode konnten Iso-Acteosid (**12**) (R_f = 0,56, 4,6 mg) (Miyase et al. 1982; Kawada et al. 2002) und Acteosid (**11**) (R_f = 0,63, 5,2 mg) (Sasaki et al. 1978; Miyase et al. 1982; Andary et al. 1989) isoliert und anschließend mittels ¹H NMR und FAB-MS strukturell aufgeklärt werden.

Der restliche evaporierte Ethylacetat-Rohextrakt (2,6 g) wurde in 4 g Celite 545 aufgenommen und auf eine mit LiChroprep RP-18 Material (28,5 g) gefüllte Chromatographiesäule (2,5 cm x 32 cm), die an ein Pumpsystem (Modell Duramat) angeschlossen war, gegeben. Die Trennung erfolgte sequentiell mit einem Wasser-Methanol Gemisch, beginnend mit 400 mL im Verhältnis 80:20 (V/V), weiterführend mit 200 mL im Verhältnis 70:30 (V/V), 200 mL (60:40 V/V), 100 mL (40:60 V/V) und endend mit 100 mL reinem Methanol bei einer konstanten Tropfgeschwindigkeit von 2,8 mL/min in 14 Fraktionen (inklusive Vorlauf und Nachlauf) (Tabelle 6).

Tabelle 6 Fraktionierung des Ethylacetat-Extraktes (2,60 g) von *Stachytarpheta guatemalensis*

Fraktionen	Wasseranteil in %	Methanolanteil in %	Menge an Elutionsmittel in mL
Vorlauf	80	20	200
A1	80	20	50
A2	80	20	50
A3	80	20	50
A4	80	20	50
B1	70	30	50
B2	70	30	50
B3	70	30	50
B4	70	30	50
C1	60	40	100
C2	60	40	100
D1	40	60	50
D2	40	60	50
Nachlauf		100	100

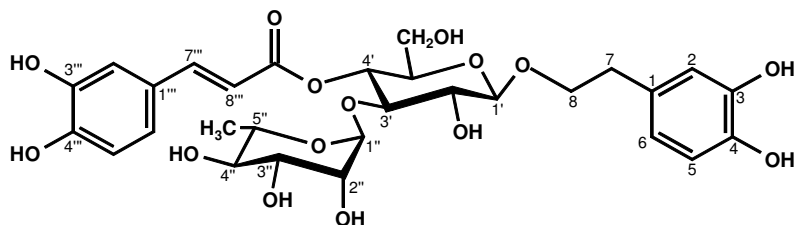
Die einzelnen Fraktionen wurden in 1 mL Methanol gelöst und bandförmig (0,5 cm) auf Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) aufgetragen. Als Fließmittel wurde ein Gemisch der Komponenten Ameisensäure, Wasser und Ethylacetat im Verhältnis 9:9:82 verwendet. Die Platten wurden nach der Entwicklung unter der UV-Lampe betrachtet, Fluoreszenzlöschungen markiert und abschließend mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) besprüht und ausgewertet. Fraktion C2 wurde einer präparativen Dünnschichtchromatographie unterzogen. Die Laufstrecke für diese Isolierung wurde auf 10 cm festgelegt, jede der 7 Platten wurde zur besseren Trennung zweimal entwickelt.

Unter der UV-Lampe wurden zwei intensive Fluoreszenzminderungen bei 254 nm mit feinen Bleistiftstrichen markiert und anschließend 2 cm Abschnitte dieser Platten mit

Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) fein besprüht und luftgetrocknet. Im UV-Licht bei 365 nm zeigten diese markierten Bereiche intensive Fluoreszenzen. Die R_f -Werte wurden anhand der DC-Plattenabschnitte ermittelt und die Kieselgelschicht an der markierten Stelle mit einem Spatel herausgekratzt. Das mit der jeweiligen Substanz erhaltenen Kieselgelpulver wurde mit einem geeigneten Lösemittel (Aceton) extrahiert, zentrifugiert, der Überstand in einen Rundkolben (50 mL) überführt und abrotiert.

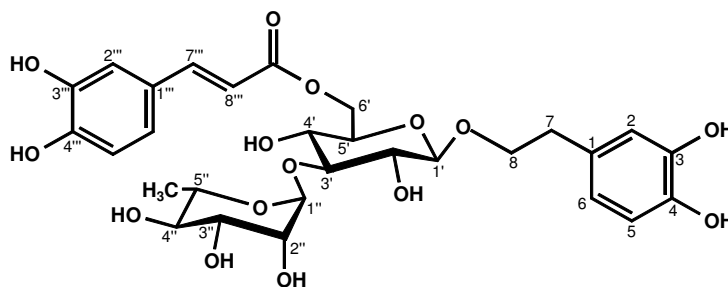
Mittels dieser Technik konnten Leucosceptosid A (**13**) ($R_f= 0,57$, 5,9 mg) (Miyase et al. 1982; Sasaki et al. 1989) und ein Gemisch aus Martynosid (**14**) und Jionosid D (**15**) ($R_f= 0,61$, 18,1 mg und 9,1 mg) (Sasaki et al. 1978; Miyase et al. 1982; Calis et al. 1984; Teborg, 1989) isoliert und anschließend mittels ^1H NMR und FAB-MS strukturell aufgeklärt werden.

3.2.4.2.1 Charakterisierung der Phenylethanoidglykoside (11-15) aus *S. guatemalensis*
Acteosid [11]



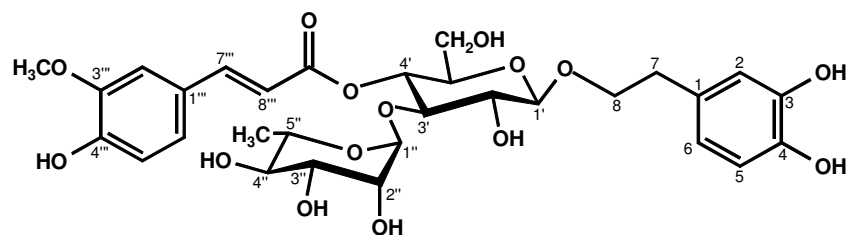
Menge:	5,2 mg
Eigenschaften:	gelbliches Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _F -Wert: 0,63 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): grün-gelb
Summenformel:	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅
(-)-FAB-MS, m/z:	623 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ _H (ppm):	1,09 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,1 Hz, H-6''); 2,79 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H-7); 3,28 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz, H- 4''); 3,39 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz, H-2'); 3,53- 3,61 (1H, <i>m</i> , H-6'a); 3,53-3,61 (1H, <i>m</i> , H- 5''); 3,53-3,61 (1H, <i>m</i> , H-5'); 3,53-3,61 (1H, <i>m</i> , H-3''); 3,53-3,61 (1H, <i>m</i> , H-6'b); 3,72 (1H, <i>m</i> , H-8a); 3,81 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz, H-3'); 3,91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 3,0 Hz, H-2''); 4,05 (1H, <i>m</i> , H-8b); 4,37 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H-1'); 4,95 (1H, H-4', unter Wasser); 5,18 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,5 Hz, H-1''); 6,27 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9 Hz, H-8'''); 6,56 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 8,0 Hz, H-6); 6,67 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H-5); 6,69 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-2); 6,77 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H-5'''); 6,95 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 8,0 Hz, H-6'''); 7,05 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-2'''); 7,59 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9 Hz, H-7''')

Iso-Acteosid [12]



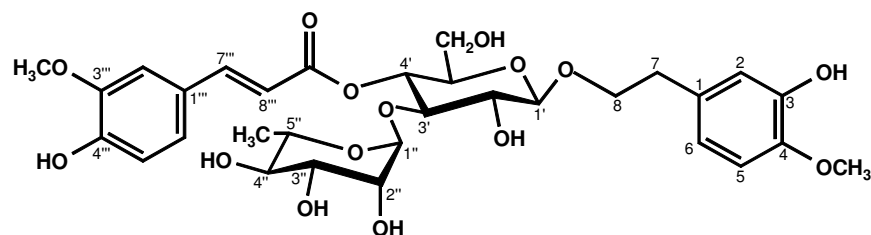
Menge:	4,6 mg
Eigenschaften:	beiges Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _F -Wert: 0,56 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb-orange
Summenformel:	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅
(-)-FAB-MS, m/z:	623 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ _H (ppm):	1,24 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz, H-6''); 2,77 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz, H-7); 3,30 (1H, <i>m</i> , H-2', unter Methanol); 3,38 (1H, <i>m</i> , H-4''), 3,39 (1H, <i>m</i> , H-4'); 3,52 (1H, <i>m</i> , H-3''); 3,53 (1H, <i>m</i> , H-5'); 3,69 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,2 Hz, <i>J</i> = 9,5 Hz, H-3''); 3,70 (1H, <i>m</i> , H-8a); 3,93 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 3,3 Hz, H-2''); 3,97 (1H, <i>m</i> , H-8b); 3,98 (1H, <i>m</i> , H-5''); 4,32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H-1'); 4,34 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz, <i>J</i> = 12,0 Hz, H-6'a); 4,49 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 12,0 Hz, H-6'b); 5,17 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,5 Hz, H-1''); 6,28 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16,0 Hz, H-8'''); 6,53 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 8,0 Hz, H-6); 6,62 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H-5); 6,66 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-2); 6,76 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H- 5'''); 6,89 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 8,0 Hz, H-6'''); 7,02 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-2'''); 7,55 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16,0 Hz, H-7''')

Leucosceptosid A [13]



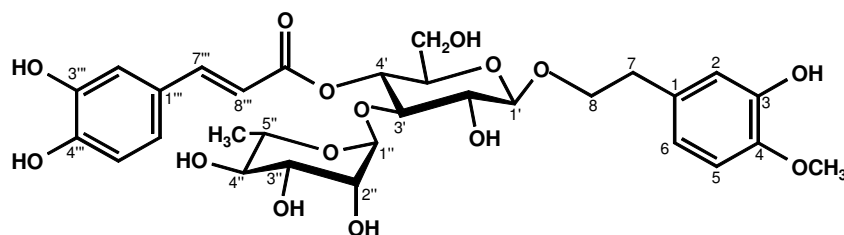
Menge:	5,9 mg
Eigenschaften:	gelb-weißes Pulver
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _f -Wert: 0,57 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅
(+)-FAB-MS, m/z:	661 [M+Na] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	637 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ _H (ppm):	1,10 (3H, d, J = 6,2 Hz, H-6''); 2,79 (2H, t, J = 6,2 Hz, H-7); 3,20-4,03 (9H, m); 3,79 (1H, m, H-8a); 3,88 (3H, s, OCH ₃); 4,05 (1H, m, H-8b); 4,37 (1H, d, J = 7,9 Hz, H- 1'); 4,93 (1H, t, J = 9,12 Hz, H-4'); 5,19 (1H, d, J = 1,5 Hz, H-1''); 6,37 (1H, d, J = 15,8 Hz, H-8'''); 6,56 (1H, dd, J = 1,9, J = 8,1 Hz, H-6); 6,67 (1H, d, J = 7,9 Hz, H-5); 6,69 (1H, d, J = 1,9 Hz, H-2); 6,81 (1H, d, J = 8,2 Hz, H-5'''); 7,08 (1H, dd, J = 1,7 Hz, J = 8,2 Hz, H-6'''); 7,19 (1H, d, J = 1,7 Hz, H-2'''); 7,66 (1H, d, J = 15,8 Hz, H-7''')

Martynosid [14]



Menge:	18,1 mg
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _f -Wert: 0,61 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅
(+)-FAB-MS, m/z:	675 [M+Na] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	651 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ _H (ppm):	1,10 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,21 Hz, H-6''); 2,82 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz, H-7); 3,37-4,03 (7H, <i>m</i>); 3,75 (1H, <i>m</i> , H-8a); 3,81 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -4); 3,89 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -3'''); 4,07 (1H, <i>m</i> , H-8b); 4,37 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H-1'); 4,92 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,4 Hz, H-4'); 5,19 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,7 Hz, H- 1''); 6,36 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9 Hz, H-8'''); 6,68 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 8,1 Hz, H-6); 6,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz, H-2); 6,80 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz, H-5); 6,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1 Hz, H-5'''); 7,08 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,8 Hz, <i>J</i> = 8,2 Hz, H- 6'''); 7,19 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,8 Hz, H-2'''); 7,66 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9 Hz, H-7''')

Jionosid D [15]



Menge:	9,1 mg
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]); R _f -Wert: 0,61 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅
(+)-FAB-MS, m/z:	661 [M+Na] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	637 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ _H (ppm):	1,15 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2 Hz, H-6''); 2,82 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz, H-7); 3,36-4,03 (9H, <i>m</i>); 3,76 (1H, <i>m</i> , H-8a); 3,81 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -4); 4,05 (1H, <i>m</i> , H-8b); 4,37 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz, H- 1'); 4,92 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,4 Hz, H-4'); 5,20 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,7 Hz, H-1''); 6,27 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9 Hz, H-8'''); 6,68 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 8,1 Hz, H-6); 6,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-2); 6,76 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz, H-5'''); 6,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1 Hz, H-5); 6,94 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 8,0 Hz, H-6'''); 7,06 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,7 Hz, H-2'''); 7,59 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,6 Hz, H-7''')

3.2.4.3 Extraktion und Untersuchung von *Momordica foetida*

Die an der Luft getrockneten und zerkleinerten **Blätter** (345 g) von *M. foetida* Schum. wurden dreimal mit je 1,5 L Methanol für 12 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Evaporation am Rotationsverdampfer (40°C, Wasserbad) wurde der Extrakt (52,2 g) mit 0,30 L einer 2% igen (m/V) Weinsäure-Lösung angesäuert. Der wässrige Auszug wurde mit Petrolether (3x 0,30 L), Dichlormethan (3x 0,30 L), Ethylacetat (3x 0,30 L) und Butanol (3x 0,30 L) extrahiert. Die jeweils vereinigten und über Natriumsulfat getrockneten Phasen wurden im Vakuum zur Trockne einrotiert.

Petrolether-Rohextrakt:	1,95g
Dichlormethan-Rohextrakt:	0,29 g
Ethylacetat-Rohextrakt:	2,00 g
Butanol-Rohextrakt	1,75 g

Der evaporierte Ethylacetat-Extrakt (2,00 g) wurde in 5 mL Methanol gelöst und über eine offene und mit Sephadex LH 20 (40 g) gefüllte Glassäule (2,5 cm x 32 cm) gegeben. Die aufgegebene Extraktlösung wurde mit 250 mL Methanol bei einer konstanten Tropfgeschwindigkeit von 2,0 mL/min in 50 Fraktionen à 5 mL getrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend einer analytischen Dünnschichtchromatographie unterzogen. Dazu wurden Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) geviertelt und die einzelnen Fraktionen punktförmig (5 µL jeweils) aufgetragen und mit dem Fließmittelgemisch Ameisensäure, Wasser und Ethylacetat im Verhältnis 9:9:82 entwickelt. Anhand dieser Kontroll-Dünnschichtchromatographie konnten einzelne Fraktionen vereint werden.

Aus den vereinigten Fraktionen 13-17 kristallisierte spontan 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-O-β-D-glucopyranosid (Prunin) **16** (4 mg).

Die vereinigten Fraktionen 11-12 wurden mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt. Das geeignete Fließmittel bestand aus den Komponenten Ameisensäure, Wasser und Ethylacetat im Verhältnis 9:9:82. Zur Durchführung der präparativen Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) verwendet. Fraktion 11-12 (240 mg) wurde in 5 mL Methanol gelöst und zweimal bandförmig auf die Startlinie (über 18 cm) aufgetragen. Die Laufstrecke für diese Isolierung wurde auf 13 cm festgelegt, jede der 7 Platten wurde zur besseren Trennung zweimal entwickelt. Die

Platten wurden nach der Entwicklung in der Regel luftgetrocknet, um den Ameisensäuregeruch etwas zu reduzieren und wurden vorsichtig mit einem Fön nachgetrocknet. Unter der UV-Lampe wurden Fluoreszenzminderungen bei 254 nm mit feinen Bleistiftstrichen markiert und anschließend 2 cm Abschnitte dieser Platten mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) fein besprüht und luftgetrocknet. Im UV bei 365 nm fluoreszierten die markierten Bereiche. Die R_f -Werte wurden anhand der DC-Plattenabschnitte ermittelt und die Kieselgelschicht an der markierten Stelle mit einem Spatel herausgekratzt. Die Fraktion 11-12 ergab 5,7-Dihydroxychromon-7-*O*- β -D-glucopyranosid (**19**) ($R_f = 0,49$, 7 mg).

Die vereinten Fraktionen 18-24 wurden ebenfalls mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt. Fraktion 18-24 (248 mg) wurde in 2 mL Methanol gelöst und zweimal bandförmig auf die Startlinie (über 18 cm) aufgetragen. Die Laufstrecke für diese Isolierung wurde auf 13 cm festgelegt, die Anzahl der Platten betrug insgesamt 7 Stück und das Fließmittel setzte sich aus den Komponenten Wasser, Methanol und Ethylacetat im Verhältnis 8:15:77 zusammen. Die getrockneten DC-Platten wurden unter der UV-Lampe betrachtet und Fluoreszenzminderungen bei 254 nm markiert und anschließend 2 cm Abschnitte dieser Platten mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) besprüht und luftgetrocknet. Im UV-Licht bei 365 nm erschienen Fluoreszenzen. Die R_f -Werte wurden anhand der DC-Plattenabschnitte ermittelt und die unbesprühte Kieselgelschicht an der markierten Stelle mit einem Spatel herausgekratzt. Das mit der jeweiligen Substanz erhaltene Kieselgelpulver wurde mit Aceton extrahiert, zentrifugiert, der Überstand in einen Rundkolben (50 mL) überführt und abrotiert. Insgesamt wurden drei Zonen isoliert, allerdings erwies sich nur das Substanzgemisch mit einem R_f -Wert von 0,68 als viel versprechend. Es wurde mit der analytischen HPLC in einzelne Komponenten aufgetrennt. Zur Auftrennung wurde ein Fließmittelgemisch aus Wasser und Methanol ohne Zusatz von Phosphorsäure, beginnend bei 70:30, nach 20 Minuten 30:70 und abschließend nach 30 Minuten 1:99 verwendet. Mit dieser Methode konnten 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7-*O*- β -D-glucopyranosid (Eriodictyol-7-*O*- β -D-glucopyranosid) (**17**) ($R_t = 370$ s, 2,6 mg), sowie Kämpferol-7-*O*- β -D-glucopyranosid (Populnin) (**18**) ($R_t = 723$ s, 4,1 mg) und nochmals 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-*O*- β -D-glucopyranosid (Prunin) (**16**) ($R_t = 492$ s, 4,2 mg) isoliert werden.

Der evaporierte Butanol-Extrakt (1,75 g) wurde in 4 mL Methanol gelöst und über eine offene und mit Sephadex LH 20 (80 g) gefüllte Glassäule (2,5 cm x 64 cm) gegeben. Die aufgegebene Extraktlösung wurde mit 550 mL Methanol bei einer konstanten Tropfgeschwindigkeit von 1,2 mL/min in 255 Fraktionen à 2 mL getrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend einer analytischen Dünnschichtchromatographie unterzogen. Dazu wurden Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) geviertelt und die einzelnen Fraktionen punktförmig (5 µL jeweils) aufgetragen und mit dem Fließmittelgemisch aus Eisessig, Wasser und Butanol im Verhältnis 10:40:50 entwickelt (Mischung im Schütteltrichter, Verwendung der Oberphase). Die Laufstrecke wurde auf 7 cm festgelegt, die Platten wurden nach der Entwicklung in der Regel luftgetrocknet und vorsichtig mit einem Fön nachgetrocknet. Unter der UV-Lampe wurden Fluoreszenzminderungen bei 254 nm markiert und anschließend diese Platten mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) fein besprüht und luftgetrocknet. Im UV-Licht bei 365 nm konnte man einige intensive Fluoreszenzfarben erkennen. Anhand der Höhe der Fluoreszenzen wurden einzelne Fraktionen vereint.

Die vereinten Fraktionen 196-230 (93,3 mg) wurden mit der präparativen Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Dazu wurde die evaporierte Fraktion in 1 mL Methanol gelöst und zweimal bandförmig auf die Startlinie (über 18 cm) aufgetragen. Die Laufstrecke für diese Isolierung wurde auf 12 cm festgelegt und die Anzahl der Platten betrug insgesamt 9 Stück. Das Fließmittel setzte sich aus den Komponenten Eisessig, Wasser und Butanol im Verhältnis 10:40:50 (Mischung im Schütteltrichter, Verwendung der Oberphase) zusammen. Nach der zweimaligen Entwicklung wurden die Platten luftgetrocknet und danach vorsichtig mit einem Fön nachbehandelt. Die Betrachtung unter der UV-Lampe bei 254 nm ergab 7 Fluoreszenzminderungen, die mit feinen Bleistiftstrichen markiert und anschließend 2 cm Abschnitte dieser Platten mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) sowie versuchsweise mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (AS) fein besprüht und luftgetrocknet wurden. Im UV-Licht bei 365 nm zeigten sich Fluoreszenzen nach dem Besprühen mit (NST/PEG). Die R_F-Werte wurden anhand der DC-Plattenabschnitte ermittelt und die Kieselgelschicht an der markierten Stelle mit einem Spatel herausgekratzt. Das mit der jeweiligen Substanz erhaltenen Kieselgelpulver wurde mit Aceton extrahiert,

zentrifugiert, der Überstand in einen Rundkolben (50 mL) überführt und abrotiert. Mit dieser Methode konnten erneut 5,7-Dihydroxychromon-7-*O*- β -D-glucopyranosid (**19**) $R_f = 0,65$, 10,9 mg), 7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7-*O*- β -D-glucopyranosid (Eriodictyol-7-*O*- β -D-glucopyranoside) (**17**) $R_f = 0,74$, 13,9 mg) sowie Kämpferol-7-*O*- β -D-glucopyranosid (Populnin) (**18**) $R_f = 0,79$, 10,2 mg) isoliert werden.

Der zur Trockne evaporierte Dichlormethan-Extrakt (0,29 g) wurde mit 0,90 g Celite 545 aufgenommen und auf eine mit LiChroprep RP-18 Material (42 g) gefüllte Chromatographiesäule (3 cm x 32 cm), die an ein Pumpsystem (Modell Duramat) angeschlossen war, gegeben. Der Extrakt wurde sequentiell mit einem Wasser-Methanol-Gemisch in 123 Fraktionen getrennt. Zuerst wurden 170 mL einer Mischung im Verhältnis 60:40 (V/V), danach 100 mL (40:60 V/V), 100 mL (20:80 V/V) und schließlich weitere 300 mL reines Methanol bei einer konstanten Tropfgeschwindigkeit von 1 mL/min zur Eluierung verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7 Fraktionierungsschema des Dichlormethan-Extraktes (0,29 g) von *Momordica foetida*

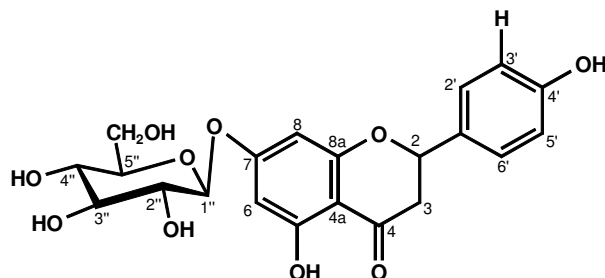
Fraktionen	Wasseranteil in %	Methanolanteil in %	Menge an Elutionsmittel in mL
Vorlauf	60	40	20
1-29	60	40	150
30-49	40	60	100
50-69	20	80	100
70-89		100	100
90-123		100	200

Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend einer analytischen Dünnschichtchromatographie unterzogen. Dazu wurden Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) geviertelt und die einzelnen Fraktionen punktförmig auf die Miniaturplatten (5 μ L jeweils) aufgetragen und sowohl in dem Fließmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat 1:1 (V/V) als auch im Fließmittelgemisch Chloroform: Ethanol im Verhältnis 95:5 entwickelt. Nach der Lufttrocknung wurden die Platten unter der UV-Lampe bei 254 nm betrachtet und Fluoreszenzminderungen markiert. Die Platten des ersten Fließmittels wurden mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) und die Platten des zweiten mit Vanillin-Phosphorsäure Reagenz B (VPS) fein besprüht und luftgetrocknet. Anhand der Auswertung mittels dieser Detektionsmittel wurden einzelne Fraktionen vereinigt. Die

vereinten Fraktionen 5-14 (26 mg) ergaben Kristalle, die mittels präparativer Dünnschichtchromatographie aufgereinigt wurden. Dazu wurde diese Fraktion in 1 mL Methanol gelöst und zweimal bandförmig auf die Startlinie (über 18 cm) aufgetragen. Die Laufstrecke für die Isolierung auf insgesamt 6 Platten wurde auf 13 cm festgelegt. Das Fließmittel setzte sich aus den Komponenten Chloroform und Ethylacetat im Verhältnis 60:40 (V/V) zusammen. Die Betrachtung unter der UV-Lampe bei 254 nm ergab eine Fluoreszenzminderung, die mit feinen Bleistiftstrichen markiert und anschließend 2 cm Abschnitte dieser Platten mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) fein besprüht und luftgetrocknet wurden. Im UV bei 365 nm zeigte sich eine intensive Fluoreszenz. Der R_f -Wert wurde anhand der DC-Plattenabschnitte ermittelt und übertragen und die Kieselgelschicht an der markierten Stelle mit einem Spatel herausgekratzt. Das mit der Substanz erhaltene Kieselgelpulver wurde mit Aceton extrahiert, zentrifugiert und abrotiert. Mit dieser Methode konnte 5,7-Dihydroxychromon (**20**) ($R_f = 0,6$, 12,6 mg) isoliert werden.

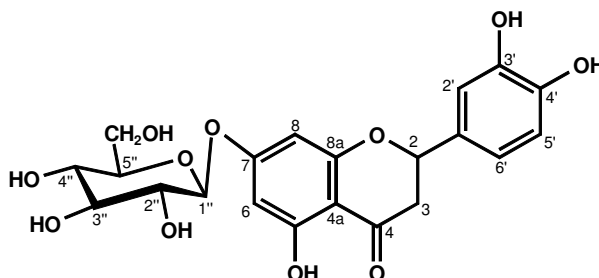
Die ebenfalls über die sequentielle Chromatographie erhaltene Fraktion 15-64 (21 mg) wurde mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt. Dazu wurden diese 21 mg in 1 mL Methanol gelöst und einmal bandförmig auf die Startlinie (über 18 cm) einer Aluminiumfolie (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) aufgetragen. Die Laufstrecke für die Isolierung auf insgesamt 8 Platten wurde auf 13 cm festgelegt. Das Fließmittel setzte sich aus den Komponenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 1:1 zusammen. Unter der UV-Lampe bei 254 nm zeigten sich 3 Fluoreszenzminderungen, die mit feinen Bleistiftstrichen markiert und anschließend 2 cm Abschnitte dieser Platten mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG) fein besprüht und luftgetrocknet wurden. Im UV bei 365 nm erschienen intensive Fluoreszenzen. Die R_f -Werte wurden anhand der DC-Plattenabschnitte ermittelt und übertragen und die Kieselgelschicht an der markierten Stelle mit einem Spatel herausgekratzt. Das mit der jeweiligen Substanz erhaltene Kieselgelpulver wurde mit Aceton extrahiert, zentrifugiert und abrotiert. Mit dieser Arbeitsweise konnte Salicylsäure (**10**) ($R_f = 0,06$, 5 mg) isoliert werden.

3.2.4.3.1 Charakterisierung der Flavonoidglykoside (16-18) aus *M. foetida*
 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-O- β -D-glucopyranosid (Prunin) [16]

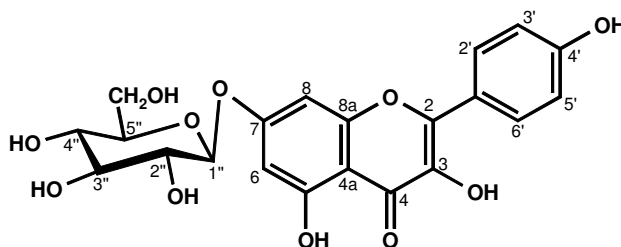


Menge:	4 mg (spontane Kristallisation) und 4,2 mg (HPLC)
Eigenschaften:	gelbe Nadeln
HPLC-System:	Knauer HPLC Pump 64 Wasser/MeOH 70:30, nach 20 min 30:70, nach 30 min 1:99 [V/V]; 1,5 mL/min; $R_t = 492$ s
Summenformel:	$C_{21}H_{22}O_{10}$
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	272 $[M]^+$ (95); 153 (96); 120 (69)
(+)-FAB-MS, m/z:	457 $[M+Na]^+$
(-)-FAB-MS, m/z:	433 $[M-H]^-$
1H NMR (400 MHz, Aceton- d_6), δ_H (ppm):	2,77 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,0$ Hz, $J = 17,0$ Hz, H-3 _{eq}); 3,23 (1H, <i>dd</i> , $J = 13,0$ Hz, $J = 17,0$ Hz, H-3 _{ax}); 3,47 (2H, <i>t</i> , $J = 8,8$ Hz, H-2'', H-3''); 3,56 (1H, <i>t</i> , $J = 8,8$ Hz, H-4''); 3,60 (1H, <i>m</i> , H-5''); 3,70 (1H, <i>dd</i> , $J = 5,3$ Hz, $J = 11,8$ Hz, H-6'' _a); 3,88 (1H, <i>dd</i> , $J = 2,3$ Hz, $J = 11,8$ Hz, H-6'' _b); 5,07 (1H, <i>d</i> , $J = 7,4$ Hz, H-1''); 5,49 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,0$ Hz, $J = 13,0$ Hz, H-2 _{ax}); 6,14 (1H, <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz, H-6); 6,17 (1H, <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz, H-8); 6,90 (2H, <i>d</i> , $J = 8,6$ Hz, H-3', H-5'); 7,38 (2H, <i>d</i> , $J = 8,6$ Hz, H-2', H-6'); 12,07 (1H, <i>s</i> , 5-OH)

5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7-*O*- β -D-glucopyranosid
 (Eriodictyol-7-*O*- β -D-glucopyranosid) [17]

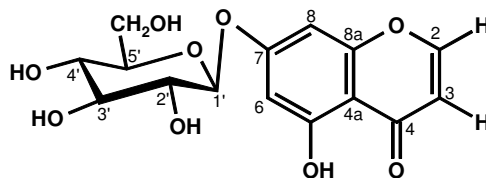


Menge:	2,6 mg (EtOAc-Extrakt) + 13,9 mg (Butanol-Extrakt)
Eigenschaften:	gelbliche Nadeln
Chromatographische Parameter:	CH ₃ COOH/H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)OH (10:40:50 [V/V/V]), Oberphase R _F -Wert: 0,74 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
HPLC-System:	Knauer HPLC Pump 64 Wasser/MeOH 70:30, nach 20 min 30:70, nach 30 min 1:99 [V/V]; 1,5 mL/min; R _t = 370 s;
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	288 [M] ⁺ (93); 153 (96); 136 (53)
(+)-FAB-MS, m/z:	473 [M+Na] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	449 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Aceton-d ₆), δ_{H} (ppm):	2,77 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz, <i>J</i> = 17,1 Hz, H-3 _{eq}); 3,20 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,6 Hz, <i>J</i> = 17,1 Hz, H-3 _{ax}); 3,47 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,3 Hz, H-2'', H-3''); 3,53 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8,9 Hz, H-4''); 3,61 (1H, <i>m</i> , H-5''); 3,70 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,4 Hz, <i>J</i> = 11,9 Hz, H-6''a); 3,89 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,9 Hz, <i>J</i> = 11,9 Hz, H-6''b); 5,08 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz, H-1''); 5,44 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz, <i>J</i> = 12,6 Hz, H-2 _{ax}); 6,13 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-8); 6,16 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-6); 6,88 (2H, <i>s</i> , H-2', H-5'); 7,04 (1H, <i>s</i> , H-6'); 12,07 (1H, <i>s</i> , 5-OH)

Kämpferol-7-O- β -D-glucoopyranosid (Populnin) [18]

Menge:	4,1 mg (EtOAc-Extrakt) + 10,2 mg (Butanol-Extrakt)
Eigenschaften:	beiges Öl
Chromatographische Parameter:	CH ₃ COOH/H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)OH (10:40:50 [V/V/V]), Oberphase R _f -Wert: 0,79 Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
HPLC-System:	Knauer HPLC Pump 64 Wasser/MeOH 70:30, nach 20 min 30:70, nach 30 min 1:99 [V/V]; 1,5 mL/min; R _t = 723 s
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
(+)-FAB-MS, m/z:	471 [M+Na] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	447 [M-H] ⁻
¹ H NMR (400 MHz, Aceton-d ₆), δ_H (ppm):	3,28 (1H, <i>m</i> , H-5''), 3,36 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz, H-2''), 3,45 (2H, <i>m</i> , H-3'', H-4''), 3,51 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,5 Hz, <i>J</i> = 11,5 Hz, H-6''a), 3,64 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz, <i>J</i> = 11,5 Hz, H-6''b), 5,26 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz, H-1''), 6,29 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz, H-6), 6,53 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz, H- 8), 6,98 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,9 Hz, H-3', H-5'), 8,15 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,9 Hz, H-2', H-6'), 12,44 (1H, <i>s</i> , 5-OH)

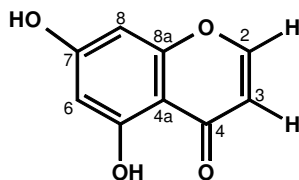
3.2.4.3.2 Charakterisierung des 5,7-Dihydroxychromonglykosid (19) aus *M. foetida*
 5,7-Dihydroxychromon-7-O- β -D-glucopyranosid [19]



Menge:	7 mg (EtOAc-Extrakt) + 10,9 mg (Butanol-Extrakt)
Eigenschaften:	hellgelbe Substanz
Chromatographische Parameter:	HCO ₂ H/H ₂ O/EtOAc (9:9:82 [V/V/V]) R _f -Wert: 0,49 (EtOAc-Extrakt) Zweifachentwicklung; CH ₃ COOH/H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)OH (10:40:50 [V/V/V]), Oberphase R _f -Wert: 0,65 (Butanol-Extrakt)
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz (NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₆ O ₉
(+)-FAB-MS, m/z:	363 [M+Na] ⁺
¹ H NMR (400 MHz, Aceton-d ₆), δ_{H} (ppm):	3,42- 3,62 (4H, <i>m</i> , H-2'', H-3'', H-4'', H-5''), 3,71 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,5 Hz, <i>J</i> = 11,5 Hz, H-6''a), 3,91 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, <i>J</i> = 11,5 Hz, H-6''b), 5,13 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz, H-1''), 6,28 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz, H-3), 6,45 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz, H-6), 6,66 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz, H-8), 8,14 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz, H-2), 12,72 (1H, <i>s</i> , 5-OH)

3.2.4.3.3 Charakterisierung des 5,7-Dihydroxychromon (20) aus *M. foetida*

5,7-Dihydroxychromon [20]



Menge:	12,6 mg
Eigenschaften:	hellgelbe, ölige Substanz
Chromatographische Parameter:	CHCl ₃ /EtOAc (6:4 [V/V])
	R _f -Wert: 0,6
	Zweifachentwicklung
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm);
	Fluoreszenz (365 nm) nach Besprühen mit
	Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz
	(NST/PEG): gelb
Summenformel:	C ₉ H ₆ O ₄
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	178 [M] ⁺ (100), 150 [M-CO] (35), 124 (26), 111 (14), 97 (22)
¹ H NMR (400 MHz, Methanol-d ₄), δ _H (ppm):	6,14 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz, H-3), 6,15 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-8), 6,27 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, H-6), 7,93 (1 H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz, H-2)