

Traditionell gegen Malaria eingesetzte  
Arzneipflanzen:

*In-vitro*-Aktivität pflanzlicher Extrakte und  
isolierter Naturstoffe aus dem Phenylpropan-  
und Terpen-Stoffwechsel gegen  
*Plasmodium falciparum*

## Inaugural-Dissertation

vorgelegt am  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

von  
CAROLA KRAFT  
aus  
Berlin

Berlin 2003



1. Gutachter:

Prof. Dr. E. Eich

2. Gutachter:

Prof. Dr. H. Kolodziej

Tag der mündlichen Prüfung:

11.02.2003



Meinen Eltern  
und  
meiner Großtante  
Friedel Schaar



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Eich angefertigt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. E. Eich für die Überlassung des Themas und für sein Verständnis, dass ich nach langem Überlegen das Thema Malaria zur Anfertigung meiner Dissertationsarbeit gewählt habe. Von ihm habe ich viel über die Bewertung und Darstellung der eigenen Arbeiten gelernt. Im Laufe meiner Promotionsarbeit hatte er immer Zeit für meine Anliegen und für seine stete Diskussionsbereitschaft möchte ich ihm an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Frau Priv. Doz. Dr. K. Jenett-Siems danke ich für die intensive Betreuung im Rahmen der praktischen Durchführung dieser Arbeit und die Überlassung der untersuchten Pflanzendrogen. Für ihre Bereitschaft die Ergebnisse zu diskutieren, speziell der Spektreninterpretationen, und für ihre Hilfe bei der Erstellung der Publikationen möchte ich mich herzlich bedanken.

Bei Herrn Dr. K. Siems, Analyticon Discovery GmbH, Potsdam, bedanke ich mich für die Aufnahme der NMR-Spektren, auch wenn die Substanzmengen manchmal sehr gering waren. Ihm und Herrn Dr. J. Jakupovic danke ich ebenfalls für ihre Hilfe bei der Spektreninterpretation.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin für die Aufnahme der EI-MS- und NMR-Spektren sowie Herrn Dr. G. Holzmann und Frau U. Ostwald, Institut für Chemie, Freie Universität Berlin, für die Anfertigung der HR-MS- und FAB-MS-Spektren und ihre rege Diskussionsbereitschaft im Rahmen der Strukturaufklärung.

Herrn Prof. Dr. U. Bienzle und Herrn Dr. F. Mockenhaupt, Institut für Tropenmedizin, Medizinische Fakultät Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, danke ich für ihre Betreuung und dass sie es ermöglichten, den *in-vitro*-Test in den Räumen des Instituts durchzuführen.

Auch den Mitarbeitern im Institut für Tropenmedizin bin ich für die Hilfe bei der Pflege der Plasmodien-Kulturen zu Dank verpflichtet.

Frau Prof. Dr. M. Schäfer-Korting, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, danke ich für die Bereitstellung des Zellerntegerätes, bei Herrn Priv. Doz. Dr. B. Kleuser für seine Hilfestellung bei der technischen Auswertung des *in-vitro*-Tests.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. M. F. Melzig und Frau Dr. G. Beyer, Institut für Pharmazie, Humboldt-Universität zu Berlin, für die Durchführung des *in-vitro*-Zytotoxizitätstests.

Bei Frau I. Köhler bedanke ich mich herzlich für ihre Bereitschaft weiteres Pflanzenmaterial aus Ghana zu beschaffen. Unsere teils konträre Herangehensweise bei der Interpretation der Ergebnisse und die Ideen für weitere Untersuchungen rundeten unsere beiden Arbeiten im Gesamtbild ab. Die freundschaftliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit mit ihr schätzte ich sehr.

Darüber hinaus möchte ich im Falle von *Bonamia spectabilis* Frau E. Bäumel-Eich für die Mithilfe beim Beschaffen des Samenmaterials sowie Frau S. Ott für die Anzucht und Pflege im institutseigenen Gewächshaus meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. W. Löwe und Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der synthetisch gewonnenen Isoflavonderivate sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie für ihre rege Anteilnahme an meiner Arbeit und für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinem Lebenspartner C. Schubert danke ich für seine Geduld und den seelischen Rückhalt in den letzten vier Jahren. Besonders in computertechnischen Fragen stand er mir jederzeit zur Seite.

Frau A. Zitscher und Herrn U. Schubert danke ich für die Durchsicht der vorliegenden Arbeit sowie für Tipps und Anregungen.

# Publikationsliste

## Originalarbeiten

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Gupta, M. P., Bienzle, U., Eich, E., 2000. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 131–135.

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Solis, P. N., Gupta, M. P., Bienzle, U., Eich, E., 2001. Andinermals A-C, antiplasmodial constituents from *Andira inermis*. *Phytochemistry* 58, 769–774.

Jenett-Siems, K., Köhler, I., Kraft, C., Beyer, G., Melzig, M. F., Eich, E., 2002. Cytotoxic constituents from *Exostema mexicanum* and *Artemisia afra*, two traditionally used plant remedies. *Pharmazie* 57, 351–352.

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Köhler, I., Tofern-Reblin, B., Siems, K., Bienzle, U., Eich, E., 2002. Antiplasmodial activity of sesquilignans and sesquieolignans from *Bonamia spectabilis*. *Phytochemistry* 60, 167–173.

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Köhler, I., Siems, K., Abbiw, D., Bienzle, U., Eich, E., 2002. Andirol A and B, two unique 6-hydroxymethylpterocarpenes from *Andira inermis*. *Zeitschrift für Naturforschung* 57c, 785–790.

Onegi, B., Kraft, C., Köhler, I., Freund, M., Jenett-Siems, K., Siems, K., Beyer, G., Melzig, M. F., Bienzle, U., Eich, E., 2002. Antiplasmodial activity of naphthoquinones and one anthraquinone from *Stereospermum kunthianum*. *Phytochemistry* 60, 39–44.

Köhler, I., Jenett-Siems, K., Kraft, C., Siems, K., Abbiw, D., Bienzle, U., Eich, E., 2002. Herbal remedies traditionally used against malaria in Ghana: bioassay-guided fractionation of *Microglossa pyrifolia* (Asteraceae). *Zeitschrift für Naturforschung* 57c, 1022–1027.

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Jakupovic, J., Mavi, S., Bienzle, U., Eich, E., 2003. *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytotherapy Research* 17, 123–128.

## Posterpräsentationen

Jenett-Siems, K., Kraft, C., Köhler, I., Siems, K., Jas, G., Ambrosi, H., Trowitsch-Kienast, W., Mockenhaupt, F. P., Bienzle, U., Eich, E., 1999. Myxochelins, iron chelators with antiplasmodial properties. Vial Henri Symposium: Drugs against parasitic diseases, Montpellier.

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Mockenhaupt, F. P., Siems, K., Mavi, S., Gupta, M. P., Bienzle, U., Eich, E., 1999. African and Central American herbal remedies traditionally used against malaria: bioassay-guided fractionation of *Artemisia afra* and *Andira inermis*. Joint Meeting of the ASP, AFERP, GA, and PSE, Amsterdam, Abstract Book 224.

Onegi, B., Kraft, C., Freund, M., Jenett-Siems, K., Siems, K., Bienzle, U., Eich, E., 2000. Herbal remedies traditionally used against malaria: *in vitro* antiplasmodial activity of naphthoquinones from *Stereospermum kunthianum* (Bignoniaceae). 6<sup>th</sup> International Congress on Ethnopharmacology of the International Society for Ethnopharmacology (ISE), Zürich, Abstract Book P2A/52.

Köhler, I., Jenett-Siems, K., Kraft, C., Siems, K., Abbiw, D., Bienzle, U., Eich, E., 2001. Herbal remedies traditionally used against malaria in Ghana: bioassay-guided fractionation of *Microglossa pyrifolia* (Asteraceae). International Symposium of the Phytochemical Society of Europe (PSE): Lead Compounds from Higher Plants, Lausanne, Abstract Book P 088.

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Solis, P. N., Gupta, M. P., Bienzle, U., Eich, E., 2001. Neue Arylbenzofurane mit antiplasmodialer Wirkung aus *Andira inermis*, Fabaceae. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG), Landesgruppe Berlin-Brandenburg: Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Berlin .

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Köhler, I., Tofern-Reblin, B., Siems, K., Bienzle, U., Eich, E., 2001. Evaluation of the *in vitro* antiplasmodial activity of sesquillignans and sesquioneolignans from *Bonamia spectabilis* (Convolvulaceae). International Symposium of the Phytochemical Society of Europe (PSE): Lead Compounds from Higher Plants, Lausanne, Abstract Book P 089.

Köhler, I., Jenett-Siems, K., Kraft, C., Siems, K., Abbiw, D., Bienzle, U., Eich, E., 2002. Herbal remedies traditionally used against malaria in Ghana: phytochemical investigations of *Microglossa pyrifolia* (Asteraceae). 50<sup>th</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Barcelona, Abstract Book A256.

Köhler, I., Jenett-Siems, K., Kraft, C., Krěn, V., Ulrichova, J., Bienzle, U., Eich, E., 2002. *In vitro* antiplasmodial activities of semisynthetic oligomeric ergolines. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Berlin, Archiv der Pharmazie 335 (Suppl. 1) P:B15 140.

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Köhler, I., Siems, K., Abbiw, D., Bienzle, U., Eich, E., 2002. Andriol A and B, two unique rotenoid-type flavonoids from *Andira inermis*. 50<sup>th</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Barcelona, Abstract Book B217.

Kraft, C., Jenett-Siems, K., Köhler, I., Beyer, G., Melzig, M. F., Bienzle, U., Eich, E., 2002. Antiplasmodial activity of dimeric and trimeric lignan/neolignan-type phenylpropanoids. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Berlin, Archiv der Pharmazie 335 (Suppl. 1) P:B16 140.

## Diskussionsbeiträge

Kraft, C., Köhler, I., Jenett-Siems, K., Mockenhaupt, F. P., Siems, K., Gupta, M. P., Bienzle, U., Eich, E., 1999. Traditionell gegen Malaria eingesetzte Arzneipflanzen: *In vitro*-Untersuchung mittelamerikanischer Pflanzen gegen *Plasmodium falciparum*. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG), Landesgruppe Berlin-Brandenburg: Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Berlin .

Jenett-Siems, K., Kraft, C., Köhler, I., Bienzle, U., Eich, E., 2001. *In vitro* Kultur von *Plasmodium falciparum* zur Evaluierung der antiplasmodialen Aktivität pflanzlicher Extrakte und isolierter Reinsubstanzen. Einsatz tierischer Zellkultursysteme in der Phytopharmakaforschung, Workshop, Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung/Gesellschaft für Zell- und Gewebezüchtung, Berlin.

Jenett-Siems, K., Köhler, I., Kraft, C., Siems, K., Jakupovic, J., Gupta, M. P., Bienzle, U., 2002. Plants traditionally used against malaria: investigation of Panamanian plant species. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Berlin , Archiv der Pharmazie 335 (Suppl. 1) V:B6 70.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Malaria	2
1.1.1	Der Malariaerreger und sein Entwicklungszyklus	3
1.1.2	Morphologische Merkmale von <i>Plasmodium falciparum</i>	4
1.1.3	Klinik der Malaria	6
1.1.4	Verbreitung der Malaria	7
1.1.5	Therapie der Malaria	7
1.2	Ethnobotanik	9
1.2.1	Naturstoffe mit antiplasmodialer Wirkung	9
1.2.1.1	Alkaloide	10
1.2.1.2	Terpenoide	16
1.2.1.3	Chinone, Phenole und andere sekundäre Naturstoffe	21
1.3	Zielsetzung	26
<b>2</b>	<b>Hauptteil</b>	<b>27</b>
2.1	<i>In-vitro</i> -Screening von Pflanzenextrakten	28
2.1.1	Untersuchte Heilpflanzen aus Panama	28
2.1.2	Untersuchte Heilpflanzen aus Zimbabwe	28
2.1.3	Untersuchte Heilpflanzen aus Uganda	28
2.1.4	Untersuchte Heilpflanzen aus Ghana	30
2.2	Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen I	31
2.2.1	Phytochemische Untersuchung von <i>Andira inermis</i>	31
2.2.1.1	Strukturaufklärung der Isoflavone <b>1-7</b>	32
2.2.1.2	Strukturaufklärung der Flavanonolglykoside <b>8-10</b>	36
2.2.1.3	Strukturaufklärung der Flavanone <b>11-12</b>	38
2.2.1.4	Strukturaufklärung der 2-Arylbenzofurane <b>13-16</b>	40
2.2.1.5	Strukturaufklärung der Pterocarpane <b>17-19</b>	47
2.2.1.6	Strukturaufklärung weiterer Substanzen <b>20-21</b>	50
2.2.2	Pharmakologische Untersuchung von <i>Andira inermis</i>	54
2.2.3	Untersuchung des Milchextraktes aus den Zweigen von <i>Andira inermis</i>	56
2.2.4	<i>In-vitro</i> -Aktivität einiger synthetischer Isoflavone	57
2.2.5	Phytochemische Untersuchung von <i>Artemisia afra</i>	59
2.2.5.1	Strukturaufklärung der Sesquiterpenlaktone <b>22-29</b>	61
2.2.5.2	Strukturaufklärung der Flavonoide <b>30-36</b>	67
2.2.5.3	Strukturaufklärung des Cumarins <b>37</b>	70
2.2.6	Pharmakologische Untersuchung von <i>Artemisia afra</i>	71

2.2.7	Phytochemische Untersuchung von <i>Vernonia colorata</i> . . . . .	74
2.2.7.1	Strukturaufklärung der Sesquiterpenlaktone <b>38-41</b> . . . . .	75
2.2.8	Pharmakologische Untersuchung von <i>Vernonia colorata</i> . . . . .	78
2.2.9	Phytochemische Untersuchung von <i>Stereospermum kunthianum</i> . . . . .	80
2.2.9.1	Strukturaufklärung der Naphthochinone <b>42-44</b> . . . . .	81
2.2.10	Pharmakologische Untersuchung von <i>Stereospermum kunthianum</i> . . . . .	85
2.3	Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen II . . . . .	87
2.3.1	Phytochemische Untersuchung von <i>Bonamia spectabilis</i> . . . . .	87
2.3.1.1	Strukturaufklärung der Lignane/Neolignane <b>45-47</b> . . . . .	88
2.3.1.2	Strukturaufklärung der Sesquilignane <b>48-56</b> . . . . .	90
2.3.1.3	Strukturaufklärung der Sesquieolignane <b>57-58</b> . . . . .	95
2.3.2	Pharmakologische Untersuchung von <i>Bonamia spectabilis</i> . . . . .	95
2.3.3	Untersuchung der Empfindlichkeit von <i>Plasmodium falciparum</i> ge- genüber Bonaspectin C 4''- $\beta$ -glukosid ( <b>50</b> ) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium . . . . .	97
2.3.4	Weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf den Wirkmecha- nismus von Bonaspectin C 4''- $\beta$ -glukosid ( <b>50</b> ) . . . . .	100
2.3.5	Pharmakologische Untersuchungen verschiedener Teezubereitungen von <i>Artemisia annua</i> . . . . .	104
2.3.6	Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Birkenblättern und Orthosiphonblättern . . . . .	107
2.3.6.1	Phytochemische Untersuchung von Birkenblättern . . . . .	107
2.3.6.2	Strukturaufklärung des Flavons <b>59</b> . . . . .	108
2.3.6.3	Pharmakologische Untersuchung von Birkenblättern . . . . .	109
2.3.6.4	Phytochemische Untersuchung von Orthosiphonblättern . . . . .	109
2.3.6.5	Strukturaufklärung der Flavone <b>60-62</b> . . . . .	109
2.3.6.6	Pharmakologische Untersuchung von Orthosiphonblättern . . . . .	111
<b>3</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>113</b>
3.1	Phytochemische Untersuchungen . . . . .	113
3.1.1	Inhaltsstoffe von <i>Andira inermis</i> . . . . .	113
3.1.2	Inhaltsstoffe von <i>Artemisia afra</i> . . . . .	116
3.1.3	Inhaltsstoffe von <i>Vernonia colorata</i> . . . . .	117
3.1.4	Inhaltsstoffe von <i>Stereospermum kunthianum</i> . . . . .	117
3.1.5	Inhaltsstoffe von <i>Bonamia spectabilis</i> . . . . .	118
3.2	Pharmakologische Untersuchungen . . . . .	118
3.2.1	<i>In-vitro</i> -Aktivität der Extrakte . . . . .	118
3.2.2	<i>In-vitro</i> -Aktivität der Sesquiterpene . . . . .	119
3.2.3	<i>In-vitro</i> -Aktivität der Phenole und Chinone . . . . .	120
3.2.4	Beurteilung der traditionellen Heilpflanzen . . . . .	125
3.3	Ausblick . . . . .	126
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>127</b>

<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>129</b>
5.1	Pflanzenmaterial	129
5.1.1	Untersuchte Heilpflanzen aus Panama	129
5.1.2	Untersuchte Heilpflanzen aus Zimbabwe	130
5.1.3	Untersuchte Heilpflanzen aus Uganda	131
5.1.4	Untersuchte Heilpflanzen aus Ghana	131
5.1.5	Untersuchung weiterer Pflanzen	131
5.2	Allgemeine Bedingungen	133
5.2.1	Geräte	133
5.2.2	Stationäre Phasen und Trennsäulen	134
5.2.3	Lösemittel und Detektionsmittel	135
5.3	Extrakterstellung	136
5.3.1	Herstellung der Pflanzenextrakte für das <i>in-vitro</i> -Screening gegen <i>Plasmodium falciparum</i>	136
5.3.2	Herstellung ausgewählter wässriger Extrakte	136
5.4	Biologische Methoden	137
5.4.1	Testorganismus	137
5.4.2	Kulturbedingungen	137
5.4.2.1	Waschmedium	137
5.4.2.2	Komplettmedium	137
5.4.2.3	Humanserum	138
5.4.2.4	Erythrozytensuspension	138
5.4.2.5	Kultivierung	138
5.4.2.6	Ausstriche	138
5.4.2.7	Auftauen der Kulturen	139
5.4.2.8	Einfrieren der Kulturen	139
5.4.2.9	Synchronisation der Kulturen	139
5.4.3	<i>In-vitro</i> -Aktivitätstest gegen <i>Plasmodium falciparum</i>	140
5.4.3.1	Probenvorbereitung	140
5.4.3.2	Testmedium	140
5.4.3.3	Durchführung und Auswertung	140
5.4.3.4	Visuelle Auswertung nach Synchronisation	141
5.4.4	<i>In-vitro</i> -Zytotoxizitätstest gegen ECV-304-Zellen	141
5.4.4.1	Kultivierung der Zellen	141
5.4.4.2	Testdurchführung und -auswertung	142
5.4.5	Bestimmung des Selektivitätsindex	142
5.5	Phytochemische Untersuchung von <i>Andira inermis</i>	143
5.5.1	Extraktion und Isolierung der Verbindungen <b>1-21</b>	143
5.5.1.1	Extraktion der Zweigdroge aus Panama	143
5.5.1.2	Extraktion der Blattdroge aus Panama	144
5.5.1.3	Extraktion der Zweigdroge aus Ghana	145
5.5.1.4	Extraktion der Blattdroge aus Ghana	146
5.5.2	Herstellung und Aufarbeitung des Milchextraktes	148
5.5.3	Strukturaufklärung der Isoflavone <b>1-7</b>	150
5.5.4	Strukturaufklärung der Flavanonolglykoside <b>8-10</b>	157
5.5.5	Strukturaufklärung der Flavanone <b>11-12</b>	160
5.5.6	Strukturaufklärung der 2-Arylbenzofurane <b>13-16</b>	161

5.5.7	Strukturaufklärung der Pterocarpane <b>17-19</b>	165
5.5.8	Strukturaufklärung weiterer Substanzen <b>20-21</b>	168
5.6	Phytochemische Untersuchung von <i>Artemisia afra</i>	169
5.6.1	Extraktion und Isolierung der Verbindungen <b>22-37</b>	169
5.6.2	Strukturaufklärung der Sesquiterpenlaktone <b>22-29</b>	174
5.6.3	Strukturaufklärung der Flavonoide <b>30-36</b>	182
5.6.4	Strukturaufklärung des Cumarins ( <b>37</b> )	189
5.7	Phytochemische Untersuchung von <i>Vernonia colorata</i>	190
5.7.1	Extraktion und Isolierung der Verbindungen <b>38-41</b>	190
5.7.2	Strukturaufklärung der Sesquiterpenlaktone <b>38-41</b>	191
5.8	Phytochemische Untersuchung von <i>S. kunthianum</i>	196
5.8.1	Extraktion und Isolierung der Verbindungen <b>42-44</b>	196
5.8.2	Strukturaufklärung der Naphthochinone <b>42-44</b>	196
5.9	Phytochemische Untersuchung von <i>Bonamia spectabilis</i>	199
5.9.1	Extraktion und Isolierung der Verbindungen <b>45-58</b>	199
5.9.1.1	Extraktion der Krautdroge	199
5.9.1.2	Extraktion der Wurzeldroge	200
5.9.2	Strukturaufklärung der Lignane/Neolignane <b>45-47</b>	201
5.9.3	Strukturaufklärung der Sesquilignane <b>48-56</b>	204
5.9.4	Strukturaufklärung der Sesquieneolignane <b>57-58</b>	213
5.10	Phytochemische Untersuchung von Birkenblättern	214
5.10.1	Extraktion und Isolierung von Verbindung <b>59</b>	214
5.10.2	Strukturaufklärung des Flavons <b>59</b>	215
5.11	Phytochemische Untersuchung von Orthosiphonblättern	216
5.11.1	Extraktion und Isolierung der Verbindungen <b>60-62</b>	216
5.11.2	Strukturaufklärung der Flavone <b>60-62</b>	217
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>221</b>
<b>Substanzverzeichnis</b>		<b>223</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>227</b>
<b>Anhang</b>		<b>241</b>