

Kapitel 5

Experimenteller Teil

5.1 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial dienten die jeweiligen Wilddrogen, die vor Ort bei Aufenthalten in Panama und Zimbabwe von Frau Dr. K. Jenett-Siems (Institut für Pharmazie, FU Berlin, Berlin) gesammelt wurden. Das Pflanzenmaterial aus Uganda wurde von Frau Dr. B. Onegi (Department of Pharmacy, Makerere University, Kampala) während ihres Besuchs im September/Oktober 1999 in Berlin mitgebracht bzw. geschickt. Aus Ghana wurden die Pflanzen, im Besonderen *Andira inermis*, von Frau I. Köhler (Institut für Pharmazie, FU-Berlin, Berlin) mitgebracht. In der Regel wurden die ethnobotanisch genutzten Pflanzenteile gesammelt; war dies in der entsprechenden Vegetationsperiode nicht möglich, so wurden andere verfügbare Pflanzenteile ausgewählt. Herbarbelege der gesammelten Pflanzen werden an den folgenden Instituten der entsprechenden Kooperationspartner aufbewahrt:

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. Steven Mavi:

Department of Pharmacy, University of Zimbabwe, Harare, Zimbabwe.

Dr. Bernadina Onegi:

Department of Pharmacy (Pharmacognosy Unit), Makerere University, Kampala, Uganda.

Dr. Daniel Abbiw:

Department of Botany, Legon University, Legon, Accra, Ghana.

5.1.1 Untersuchte Heilpflanzen aus Panama

Aus Panama stammten insgesamt 14 Pflanzenarten, von denen fünf in den Arbeiten von Jenett-Siems (2002) und Jenett-Siems et al. (1999, 2000) näher untersucht wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine phytochemische Untersuchung von *Andira inermis* vorgenommen.

***Andira inermis* (W. WRIGHT) H.B.K., Fabaceae**

Syn.: *Geoffroea inermis* (W. WRIGHT) W. WRIGHT, *Geoffroea jamaicensis* WRIGHT, *Andira exelsa* H.B.K., *Pterocarpus sapindoides* DC. u.a.

Beschreibung: Flora of Panama (Annals of the Missouri Botanical Garden, Vol. 52, pp. 49-51).

Blätter und Zweige wurden im Gebiet um Panama City (an der Landstraße von El Llano nach Carti) im März 1997 gesammelt. Herbarbeleg: FLORPAN 2758. Die Identifikation der Pflanzen wurde von Prof. Dr. M. D. Correa A. (Herbarium of the University of Panama) durchgeführt.

5.1.2 Untersuchte Heilpflanzen aus Zimbabwe

Das Pflanzenmaterial wurde im Oktober 1997 an verschiedenen Orten in Zimbabwe gesammelt, insbesondere an der Landstraße Nyanapanda-Harare und in der Nähe von Marondera und Troutbeck. Die Pflanzenbestimmung übernahm Dr. S. Mavi (University of Zimbabwe).

***Artemisia afra* JACQ., Asteraceae**

Beschreibung: Prodomus, Flora Südwestafrika, 1967-69, Vol. 100-140.

Zur Untersuchung wurden die oberirdischen Pflanzenteile gesammelt.

Herbarbeleg: JS 9707.

***Vernonia colorata* (WILLD.) DRAKE, Asteraceae**

Syn.: *Eupatorium coloratum* WILLD., *Vernonia senegalensis* (PERS.) LESS., *Gynanthemum coloratum* (WILLD.) H. ROB & B. KAHN u.a.

Beschreibung: Flora of Tropical East Africa (The Royal Botanic Gardens, Kew With Assistance From The East African Herbarium, Compositae (Part 1), 2000, pp. 180-181).

Zur Untersuchung wurden die Blätter gesammelt.

Herbarbeleg: JS 9701.

Im Screening wurden zusätzlich die im Folgenden aufgeführten Drogen verschiedener Pflanzenarten untersucht:

die Blätter und Rinde von

***Cussonia spicata* THUNB., Araliaceae**

die Blätter von

***Vernonia natalensis* SCH. BIP., Asteraceae**

die Blätter und Zweige von

***Parinari curatellifolia* PLANCH. EX BENTH., Chrysobalanaceae**

die Blätter und Wurzeln von

***Clutia hirsuta* MÜLL. ARG., Euphorbiaceae**

die Blätter und Zweige von

***Flueggea virosa* BAILL., Euphorbiaceae**

die Blätter und Wurzeln von

***Adenia gummifera* (HARV.) HARMS, Passifloraceae**

die Wurzeln von

***Hymenodictyon floribundum* B.L. ROBINSON, Rubiaceae.**

5.1.3 Untersuchte Heilpflanzen aus Uganda

Das Pflanzenmaterial wurde in der Trockenzeit an verschiedenen Orten in Uganda gesammelt, insbesondere in der Nähe von Pacego (Nebbi District).

***Stereospermum kunthianum* CHAM., Bignoniaceae**

Syn.: *Stereospermum dentatum* A. RICH.

Beschreibung: William J. Eggeling: The Indigenous Trees Of The Uganda Protectorate, 2. ed., 1951, pp. 42-44).

Gesammelt wurde die Wurzelrinde.

Herbarbeleg: 001 BO.

Im Screening wurden zusätzlich die im Folgenden aufgeführten Drogen verschiedener Pflanzenarten untersucht:

die Blätter von

***Justicia betonica* L., Acanthaceae**

die Blätter von

***Aspilia africana* (PERS.) CD ADAMS, Asteraceae**

die Wurzeln von

***Vernonia amygdalina* DEL., Asteraceae**

die Blätter von

***Momordica foetida* SCHUMACH., Cucurbitaceae**

die Blätter und Zweigrinde von

***Crotalaria laburnifolia* L., Fabaceae**

die Blätter von

***Hoslundia opposita* VAHL., Lamiaceae**

die Stammrinde von

***Albizia coriaria* WELS. EX OLIV., Mimosaceae.**

5.1.4 Untersuchte Heilpflanzen aus Ghana

Aus Ghana stammten acht Arzneipflanzen; das Screening und die Untersuchung ausgewählter Pflanzenarten wurde von Frau I. Köhler (Köhler et al., 2002) übernommen.

***Andira inermis* (W. WRIGHT) H.B.K., Fabaceae**

Syn.: s.o.

Die Blätter wurden in dem Gebiet Upper East Region in Ghana im März 2000 gesammelt.

Herbarbeleg: GC 47682. Die Bestimmung wurde von Dr. D. Abbiw (University Legon) durchgeführt.

5.1.5 Untersuchung weiterer Pflanzen

***Bonamia spectabilis* (CHOISY) HALL. f., Convolvulaceae**

Syn: *Bonamia hildebrandtii* (VATKE) HALL. f., *Bonamia minor* HALL. f., *Bonamia minor* var. *argentea* R. E. FRIES, *Breweria spectabilis* CHOISY, *Breweria hildebrandtii* VATKE.

Beschreibung: Flora Zambesiaca (Gonçalves, 1987)

Aus den Samen, die 1990 ungefähr 70 km östlich von Morondava (Madagaskar) von Prof. Dr. E. Eich und seiner Gattin gesammelt wurden, konnten im institutseigenen Gewächshaus Pflanzen gezogen werden; diese wurden im Juni 1998 sowie im April 2001 geerntet.

Zur Untersuchung wurde das Kraut herangezogen. Anhand von Herbarbögen wurde die Pflanze von Prof. Dr. D. F. Austin (Tucson, USA) identifiziert.

***Artemisia annua* L., Asteraceae**

Die getrocknete Krautdroge von *Artemisia annua* schickte uns Prof. Dr. Lutz Heide (Pharmazeutisches Institut, Pharmazeutische Biologie, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen). Die Pflanze wurde dort im institutseigenen Anbau gezogen und im Herbst 1999 geerntet (Chargenbezeichnung: A3).

***Betula pendula* ROTH, *B. pubescens* EHRH., Betulaceae**

Die Arzneibuchdroge *Folia Betulae conc.* (Ph.Eur.Ntr.1999) wurde von der Firma Caelo käuflich erworben (Chargenbezeichnung: 00767200).

***Orthosiphon aristatus*(BL.) MIQ., Lamiaceae**

Die Arzneibuchdroge *Folia Orthosiphonis conc.* (Ph.Eur.Ntr.1998) wurde von der Firma Caelo käuflich erworben (Chargenbezeichnung: 91773170).

5.2 Allgemeine Bedingungen

5.2.1 Geräte

Optische Drehung:	Perkin Elmer 241 MC Polarimeter, Spaltbreite 0.5 μm , Na-Dampfampe 589.3 nm, 20 °C, Zelle: Länge 10 cm, 1 ml Fassungsvermögen
Lichtmikroskop:	Zeiss Standard 20, Immersionsöl (Zeiss) 515 N, 1000 fache Vergrößerung
pH-Meter:	Knick pH-Meter 761 Calimatic
Zentrifuge:	Sigma 3K-1, Abstand Rotor-Einsatz: 10 cm Eppendorf Centrifuge 5414 (für 1-2 ml Reaktionsgefäße)
LAF-Werkbank:	Laminar Air flow, Heraeus ELB 2448
Gefriertrocknungsanlage:	Christ LOC-1m, ALPHA 2-4
Zellernte:	Inotech Zellerntegerät
Flüssigszintillation:	1450 Microbeta plus Flüssigszintillator
^1H -NMR-Spektren:	Bruker DPX 400 (400 MHz) (TMS als interner Standard)
^{13}C -NMR-Spektren:	Bruker DPX 400 (100.6 MHz)
EI-MS:	Varian MAT CH ₇ A, 70 eV
HR-MS:	Finnigan MAT 711, 80 eV
FAB-MS:	Varian MAT CH ₅ DF, (DMSO/Glycerin, Xenon; CHCl ₃ /slm-Nitrobenzylalkohol, Xenon oder MeOH/Glycerin, Xenon)
Analytische HPLC	
Gerät A:	Knauer HPLC Pump 64, Knauer HPLC Programmer 50, barspec Chrom-A-Scope Detektor, barspec Chrom-A-Scope Software Package
Gerät B:	Pharmacia LKB HPLC-Gradienten-Anlage, Steuergerät LCCC 2252, High Pressure Mixer, Rheodyne 7125, Rapid Spectral Detektor 2140, HPLC-Manager und LKB Wavescan EG Software

Präparative HPLC:

Gerät A: Knauer HPLC-Gradienten-Anlage, Variable Wavelength Monitor, Software: Eurochrom

Gerät B: Pharmacia LKB HPLC-Gradienten-Anlage, 2-Pumpen-System 2248, Steuergerät LCCC 2252, High Pressure Mixer, Knauer WellChrom Lamp K-2701, Knauer Well-Chrom DAD-2700, Software: Eurochrom

MPLC: Pumpe: Modell Duramat; Cfk

5.2.2 Stationäre Phasen und Trennsäulen

Analytische DC: DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm, 20 x 20 cm (Merck)

Präparative DC: DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm, 20 x 20 cm (Merck)

Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm, 70-230 mesh, Merck)

Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia)

Celite[®] 545 Kieselgur (Fluka)

LiChroprep[®] RP-18 (Korngröße 0.040-0.063 mm, Merck)

Analytische HPLC: Eurospher 100 C-18, 7 μ m, 4 x 250 mm (Knauer)

Präparative HPLC: Eurospher 100 C-18; 10 μ m, 16 x 250 mm (Knauer)
Nucleosil P 300 C-18, 10 μ m, 16 x 250 mm (Knauer)

Extraktionssäulen: LiChrolut[®]-Festphasenextraktionssäulen, RP-18, Füllmenge 500 mg (Merck)

5.2.3 Lösemittel und Detektionsmittel

Lösemittel

Sofern die Lösemittel nicht zumindest der Qualität „zur Analyse“ entsprachen, wurden sie vor der Verwendung destilliert. Im Falle der HPLC, Sephadex-Säulen und Flash-Säulen wurde destilliertes Wasser verwendet, in allen anderen Fällen demineralisiertes Wasser.

Detektionsmittel für die Dünnschichtchromatographie

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Stahl):

Spezifität: diverse Naturstoffe, insbesondere Terpenderivate

Vorschrift: 0.5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig, 85 ml MeOH und 5 ml konz. Schwefelsäure in der gegebenen Reihenfolge gemischt. Nach dem Besprühen wird die Platte 5-10 min. bei 100-120 °C erhitzt. Die diversen Naturstoffe reagieren verschiedenfarbig.

Dragendorff's Reagenz (Munier und Macheboeuf):

Spezifität: Alkaloide, aber auch einzelne Naturstoffe wie einige Lignanderivate

- Vorschrift: A) 0.85 g basisches Wismutnitrat werden in 10 ml
Eisessig und 40 ml Wasser gelöst
B) 8 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst

Gleiche Volumina von A und B werden gemischt und lichtgeschützt aufbewahrt (Vorratslösung). Vor Gebrauch werden 1 ml Vorratslösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser gemischt. Nach dem Besprühen bilden sich orange-rote Niederschläge auf der Platte.

Naturstoff-Reagenz:

Spezifität: diverse Naturstoffe, insbesondere Flavonoide

Vorschrift: 1 g Diphenylboryloxyethylamin werden in 100 ml MeOH gelöst. Nach Besprühen und Trocknen wird die Platte unter der UV-Lampe bei 366 nm betrachtet (verschiedene Fluoreszenzfarben).

5.3 Extraktherstellung

5.3.1 Herstellung der Pflanzenextrakte für das *in-vitro*-Screening gegen *Plasmodium falciparum*

Je 20 g des getrockneten und gemahlten Pflanzenmaterials wurden dreimal mit je 150 ml PE/EtOAc (1:1; [V/V]) für 2 h bei RT extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurden die erneut getrockneten Pflanzenteile dreimal mit MeOH/H₂O (8:2; [V/V]) wiederum für 2 h bei RT extrahiert. Die Lösemittel wurden jeweils unter reduziertem Druck (Rotavapor) bei 40 °C abgezogen und der verbliebene Rückstand dem *in-vitro*-Test zugeführt. Die durch PE/EtOAc-Gemische gewonnenen Extrakte werden in dieser Arbeit als lipophile Extrakte bezeichnet, der zweite Ansatz mit MeOH/H₂O diente zur Herstellung hydrophiler Extrakte.

5.3.2 Herstellung ausgewählter wässriger Extrakte

Je 2 g der zur Verfügung stehenden Drogen von *Andira inermis*, *Artemisia afra* und *Vernonia colorata* wurden mit 20 ml kochendem demineralisiertem Wasser übergossen und abgedeckt im Sinne eines Infus 15 min. ziehen gelassen. Das Drogenmaterial wurde durch Filtration abgetrennt und der wässrige Extrakt zunächst bei - 20 °C eingefroren. Bevor den Extrakten durch Gefriertrocknung das Wasser vollständig entzogen wurde, wurde die Temperatur des Gefriergutes mit Hilfe von flüssigem Stickstoff weiter abgesenkt. Anschließend wurden die gewonnenen Trockenextrakte dem *in-vitro*-Test zugeführt.

Im Falle der Untersuchung von *Artemisia annua* (Kraut) wurden folgende fünf Teezubereitungen (Infus und Dekokte) hergestellt:

Probe 1: Infus aus 2.5 g Krautdroge auf 500 ml Wasser

Probe 2: Dekokt aus 2.5 g Krautdroge auf 500 ml Wasser (5 min. köcheln lassen)

Probe 3: Dekokt aus 2.5 g Krautdroge auf 500 ml Wasser (30 min. köcheln lassen)

Probe 4: Infus aus 4.5 g Krautdroge auf 500 ml Wasser

Probe 5: Dekokt aus 4.5 g Krautdroge auf 500 ml Wasser (5 min. köcheln lassen).

Bei der Infusherstellung wurde das Kraut mit Wasser aufgebrüht, 15 min. abgedeckt stehen gelassen, abgeseiht und der abfiltrierte Drogenrückstand dabei ausgepresst. Die Herstellung der Dekokte erfolgte nach DAB 10. Die so entstandenen Extrakte wurden ebenfalls schonend mit Hilfe der Gefriertrocknung aufgearbeitet und hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität getestet.

5.4 Biologische Methoden

5.4.1 Testorganismus

Bestimmte Stämme bzw. Klone des humanpathogenen Malariaerregers *Plasmodium falciparum* werden *in vitro* angezüchtet, um potentielle Arzneistoffe hinsichtlich ihrer Hemmwirkung dem Erreger gegenüber zu testen. In dieser Arbeit wurden ein isolierter Stamm (PoW) eines Patienten in Westafrika, der sensibel gegenüber Chloroquin ist (IC₅₀-Wert 0.011 μM) und ein multiresistenter Klon Dd2 (IC₅₀-Wert: 0.12 μM [Chloroquin]) verwendet.

5.4.2 Kulturbedingungen

Die Plasmodien wurden entsprechend der Arbeiten von Trager und Jensen (1976) über die Anzucht von humanpathogenen Malariaerregern in einer kontinuierlichen Kultur gehalten. Soweit wie möglich wurden alle Arbeiten unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank³ steril durchgeführt, um Fremdinfectionen zu vermeiden.

5.4.2.1 Waschmedium (ergibt 1 Liter)

RPMI-1640-Medium (GibcoBRL; angereichert mit 25 mM Hepes und L-Glutamin) Fertigmischung	15.89 g
NaHCO ₃ (Merck)	2.33 g
Gentamycinsulfat (Caelo)	0.04 g
Glukose, wasserfrei (Merck)	2.00 g

Der Ansatz wird zu 1000 ml mit Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa[®]; Fresenius) aufgefüllt.

Die Substanzen wurden nacheinander in einem mit ca 600 ml dest. Wasser gefüllten 1l Erlenmeyerkolben eingewogen und auf dem Magnetrührer vollständig gelöst. Nach dem Auffüllen auf 1000 ml wurde der pH-Wert auf 7.33 eingestellt. Dazu wurde je nach Ausgangslage 1N NaOH oder 1N HCl benötigt. Anschließend wurde das Waschmedium durch einen 0.22 μm Sterilfilter (Schleicher & Schuell) filtriert und in sterilisierten Laborflaschen⁴ (500 ml) bei 4 °C aufbewahrt (max. 4 Wochen; sonst neue pH-Wert Einstellung nötig).

5.4.2.2 Kompletmedium

Das Kompletmedium war eine 10 % ige Lösung aus Humanserum in Waschmedium nach anschließender Sterilfiltration (0.22 μm). Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C (max. 7-10 Tage) in 50 ml Zentrifugenröhrchen (steril). Anstelle von Humanserum kann auch Albumax[®] (GibcoBRL) verwendet werden.

³Anhang: Abbildung A1

⁴Anhang: Abbildung A2

5.4.2.3 Humanserum

Das Spendervollblut (Blutgruppe A; Rhesusfaktor positiv) wurde in BD Vacutainer SST II PLUS-Röhrchen (5 ml, 13 x 100 mm, Becton Dickenson Co.) abgenommen. Nach ca. 30 min Gerinnungszeit wurden die Röhrchen bei 3000 U/min zentrifugiert und anschließend das abgetrennte Serum in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Serumproteine wurden bei 55 °C (WB) 40 min inaktiviert. Zuletzt wurde das Serum erneut 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert und bis zum Gebrauch in 10 ml Zentrifugenröhrchen bei -80 °C eingefroren.

5.4.2.4 Erythrozytensuspension (50 % [V/V])

Das Spendervollblut (Blutgruppe A; Rhesusfaktor positiv) wurde als Heparinblut (BD Vacutainer LH 145 I.U. PLUS, 6 ml, 13 x 100 mm, Becton Dickenson Co.) abgenommen. Nach dem Abflammen und Überführen in 50 ml Zentrifugenröhrchen wurde 10 min bei 1800 U/min zentrifugiert. Die am weitesten unten abgesetzten Erythrozyten wurden mit Hilfe einer Pipette vorsichtig gewonnen und mit Waschmedium zu 50 % verdünnt. Die Suspension kann in 10 ml Kulturröhrchen bei 4 °C max. 4 Wochen aufbewahrt werden.

5.4.2.5 Kultivierung

Die Erreger wurden in sterilen 50 ml Zellkulturflaschen⁵ in 5 ml Kompletmedium und 0.5 ml Erythrozytensuspension bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Der Hämatokrit (Volumenanteil der Erythrozyten am Gesamtkulturvolumen) lag somit bei 5 %. Nach jedem Öffnen mußte die Kultur anschließend mit einer Mischung aus Stickstoff (90 %), Sauerstoff (5 %) und Kohlendioxid (5 %) durch einen 0.22 µm Sterilfilter begast werden (1 min; 1 bar)⁶. Das überstehende Medium wurde täglich gewechselt, wozu die Kulturflaschen vorsichtig aus dem Brutschrank genommen, schräg auf eine Unterlage gestellt und 15 min ruhen gelassen wurden. Mit der Pipette wurde der Überstand vorsichtig entfernt, die Kultur (Pellet) mit vorgewärmten (37 °C, WB) Kompletmedium resuspendiert und anschließend wieder begast. Die Parasitämie (Anteil infizierter Erythrozyten in Prozent) wurde zur Wachstumskontrolle über Giemsa-gefärbte Ausstriche ermittelt. Die Parasitämie sollte in Kultur 10 % nicht übersteigen. Bei gutem Wachstum ist eine dreimalige Verdünnung durch Zugabe frischer Erythrozyten pro Woche erforderlich (Parasitämie 0.1-5 %).

5.4.2.6 Anfertigung der Ausstriche

Es wurden ca. 300 µl Kulturlösung der Kulturflasche entnommen und in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Entfernen des Überstandes durch Zentrifugation wurde das Pellet mit der restlichen Lösung gemischt und ein Tropfen dieser Suspension auf einem Objektträger als dünner Film ausgestrichen⁷. Die Fixierung erfolgte mit MeOH (etwa 30 s). Nach vollständigem Abtrocknen des Alkohols wurde der Ausstrich für mindestens

⁵Anhang: Abbildung A3

⁶Anhang: Abbildung A4

⁷Anhang: Abbildung A5

10 min in der Färbelösung (10 % [V/V] Giemsa-Stammlösung [methanolische Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung, Merck] in Titrisol-Puffer pH 7.0 [Merck]) inkubiert. Die fertigen Ausstriche wurden im Immersions-Lichtmikroskop (1000 fache Vergrößerung) betrachtet.

5.4.2.7 Auftauen der Plasmodien-Kulturen

Nach dem Auftauen bei 37 °C im Wasserbad wurden die Erreger in 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und unter vorsichtigem Schütteln 0.1 ml wässrige NaCl-Lösung (12% [m/V]; steril) hinzugegeben. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT wurden tropfenweise 6 ml wässrige NaCl-Lösung (1.6 % [m/V]; steril) hinzugegeben und anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 1800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 3 ml Waschmedium vorsichtig resuspendiert und erneut 15 min zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift und Entfernen des Überstandes wurden 5.4 ml Komplettmedium und 0.6 ml Erythrozytensuspension hinzugefügt, alles in eine 50 ml Zellkulturflasche überführt und die Parasitämie bestimmt. Nach dem Auftauen empfiehlt es sich, das Medium zweimal pro Tag (3-4 Tage) zu wechseln.

5.4.2.8 Einfrieren der Plasmodien-Kulturen

Einfrierlösung:

Glycerol wasserfrei (Merck)	57.00 g
Natriumlaktat (Sigma)	1.60 g
Kaliumchlorid (Merck)	0.03 g
Natriumdihydrogenphosphat (Merck)	0.39 g

Der Ansatz wird zu 100 ml in dest. Wasser gelöst (pH-Wert 6.8).

Der gesamte Kulturansatz wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 1800 U/min zentrifugiert. Nach Entfernen des Komplettmediums wurde mit 1.5 ml Waschmedium resuspendiert und erneut 10 min, diesmal bei 1400 U/min, zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, 0.25 ml Einfrierlösung vorsichtig dazugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden weitere 0.3 ml der Lösung hinzugegeben und das Ganze in sterilisierte 2 ml Micro-Gefäße überführt. Die Lösung wurde bis zum Gebrauch bei -80 °C eingefroren.

5.4.2.9 Synchronisation mit wässriger Sorbitollösung (5 % [m/V])

Nach Überführen der Kultur in 50 ml Zentrifugenröhrchen wurde 7 min bei 1800 U/min und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Sediment vorsichtig mit 2.5 ml Sorbitollösung (steril) resuspendiert. Nach 5 min Stehenlassen (in dieser Zeit werden die Trophozoiten und Schizonten lysiert) wurde erneut zentrifugiert (10 min, 1800 U/min, 4 °C) und der Überstand entfernt. Anschließend wurde die Kultur, die jetzt ausschließlich Ringstadien (> 90 %) enthielt, mit 500 µl Erythrozytensuspension und 5 ml Kulturmedium aufgefüllt (Lambros und Vanderberg, 1979).

5.4.3 *In-vitro*-Aktivitätstest gegen *Plasmodium falciparum*

Die Durchführung des *in-vitro*-Testes erfolgte nach der Methode von Desjardins et al. (1979). Es handelt sich um die quantitative Messung der antiparasitären Aktivität durch ein Mikro-Verdünnungs-Verfahren.

Dieses Verfahren dient dazu, mit Hilfe eines Radioisotopen-Inkorporationstests eine größere Anzahl von Verbindungen gegen den Malariaerreger zu testen. Sie beruht auf Messung der Aufnahme von Tritium-markiertem Hypoxanthin in die Parasiten in einem 42 Stunden Test auf 96-Loch-Mikrotiterplatten⁸. Hypoxanthin ist ein für den Parasiten essentieller Metabolit in der Nukleinsäurebiosynthese. Eine hohe Hypoxanthin-Aufnahmerate spricht für eine hohe Wachstumsrate und ist damit ein direktes Maß für die Vitalität der Parasiten. Die Auswertung erfolgt über die Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC₅₀), diese gibt an, bei welcher Konzentration der Testsubstanz 50 % der Parasiten abgetötet worden sind.

5.4.3.1 Probenvorbereitung

Die Proben wurden zuerst in DMSO gelöst (*c* 20 mg/ml), nur bei gut wasserlöslichen Substanzen wurde die Stammlösung gleich mit Waschmedium hergestellt. Rohextrakte und Fraktionen wurden anschließend mit Waschmedium zu 1 mg/ml, isolierte Naturstoffe zu 0.5 mg/ml verdünnt. Beim Überführen auf die Mikrotiterplatte erfolgte eine weitere 1:10 Verdünnung, so daß die Anfangskonzentration (*c*₀) bei Extrakten und Fraktionen bei 100 µg/ml und bei den Naturstoffen bei 50 µg/ml lag. Konnte kein IC₅₀-Wert bestimmt werden, wurden die Proben entsprechend weiter verdünnt, z. B. wurde die Stammlösung (2 mg/ml) bei den wässrigen Extrakten von *Artemisia annua* nochmals 5 : 1000 verdünnt, so dass die Anfangskonzentration 1.0 µg/ml betrug.

5.4.3.2 Testmedium

Zunächst wurde die Parasitämie der Kultur mit Giemsa-gefärbten Ausstrichen bestimmt. Der Test wurde mit einer Parasitämie von 0.5 % und einem Hämatokrit von 2.5 % durchgeführt. Lag die Kulturparasitämie z. B. bei 5 %, so wurden für den Ansatz einer Platte 37.5 µl Pellet, 337.5 µl Erythrozyten (675 µl 50 %ige Erythrozytensuspension) und 15 ml Kompletmedium benötigt. Als Negativkontrolle diente eine Mischung aus 1 ml Kompletmedium und 50 µl Erythrozytensuspension. Die Aufteilung auf der Mikrotiterplatte war wie folgt:

Reihe A 1-5:	150 µl Testmedium als Positivkontrolle
Reihe B 1-12:	270 µl Testmedium
Reihe C-H 1-12:	150 µl Testmedium
Reihe A 7-11:	150 µl erregerefreies Testmedium (Hämatokrit 2.5 %) als Negativkontrolle

5.4.3.3 Durchführung und Auswertung

Je 30 µl Probenlösung wurde in die B-Reihe pipettiert. Extrakte und isolierte Verbindungen wurden als Triplikate, Fraktionen als Dubletts aufgetragen. Danach erfolgte eine 1:1

⁸Anhang: Abbildung A6

Verdünnung direkt auf der Platte. So erreichte man bei einer Anfangskonzentration von 50 µg/ml eine Verdünnungsreihe nach sechs Schritten bis 0.56 µg/ml. Die so präparierten Platten wurden bei 37 °C in einem Kerzentopf⁹ inkubiert. Der Kerzentopf besteht aus einem Exsikkator mit Schlichfhahn und Teelichtern. Nach Erlöschen der Kerzen wird der Hahn geschlossen, die so entstandene Gasatmosphäre entspricht dem sauerstoffarmen Milieu im Blut. Nach 24 Stunden wurden pro Loch 20 µl ³H-Hypoxanthin (1 mCi/ml) in Komplettmedium hinzupipettiert und vorsichtig gemischt. Nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurden die Zellen auf Glasfaserplatten mit Hilfe eines Zellernteegerätes dem Testansatz entzogen und nach Verschweißen mit Szintillationsplatten im Flüssigszintillationszähler die Zählrate (counts per minute [cpm]) des eingebauten Hypoxanthins gemessen. Die prozentuale Hemmkonzentration wurde wie folgt ermittelt:

$$1 - \left(\frac{\text{cpm in infiziertem Testmedium}}{\text{cpm der Negativkontrolle}} \right) \times 100.$$

Die 50 %ige Hemmkonzentration wurde graphisch durch Interpolation bestimmt¹⁰. Extrakte mit IC₅₀-Werten größer als 50 µg/ml wurden als inaktiv angesehen (O'Neill et al., 1985), während bei den Naturstoffen die Grenze zwischen 5-10 µg/ml festgesetzt wurde.

5.4.3.4 Visuelle Auswertung nach Synchronisation

Im Falle von Bonaspectin C-4'-β-glukosid aus *B. spectabilis* begann das Experiment 48 h nach der Synchronisation der Kulturen. Diese wiesen überwiegend (> 90 %) Ringformen von *P. falciparum* auf. Die Kulturen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt (2.5 % Hämatokrit, 0.5 % Parasitämie) und unter Zusatz der Testsubstanzen 48 h im Kerzentopf inkubiert. Zur Auswertung wurden mindestens 2000 Zellen pro Loch in Giemsa-gefärbten Ausstrichen ausgezählt. Die Gesamtzahl der Parasiten, ihr Entwicklungsstadium (Ringe, Trophozoiten, Schizonten) und eventuelle morphologische Auffälligkeiten wurden erfasst. Der zweite Test begann 72 h nach der Synchronisation, so dass in den Kulturen überwiegend Trophozoiten und Schizonten enthalten waren.

5.4.4 In-vitro-Zytotoxizitätstest gegen ECV-304-Zellen

Die Arbeiten zur Zytotoxizität einiger ausgewählter Naturstoffe bzw. Extrakte wurden im Arbeitskreis von Prof. M. F. Melzig (Institut für Pharmazie, Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte mit der humanen Zelllinie ECV-304 (Tumorzellen mit endothelialen Eigenschaften). Die Auswertung wurde mittels MTT-Test durchgeführt (Mosmann, 1983).

5.4.4.1 Kultivierung der Zellen

Die ECV-304-Zellen wurden in Eagle Medium 199 mit 10 %igem fetalem Kälberserum bei 37 °C und 5% CO₂ in einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert.

⁹Anhang: Abbildung A7

¹⁰Anhang: Abbildung A8

5.4.4.2 Testdurchführung und -auswertung

In 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden pro Loch 1000-1500 Zellen eingesät. Die Testsubstanzen wurden in Aceton gelöst und mit Eagle Medium 199 zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt. Die Probenzugabe (100 μ l) erfolgte nach 24 Stunden und die Inkubationszeit betrug vier Tage. Die Zell-Viabilität wurde mittels MTT-Test unter Zusatz von DMSO analysiert. Die Bildung eines violetten Formazans aus dem MTT-Reagenz (gelöst in PBS) ist proportional zur Aktivität der Dehydrogenasen in den intakten Zellen. Der Zusatz von DMSO dient der Solubilisierung des Formazans, die gebildete Menge wurde nach 15 min Schütteln bei 580 nm UV-spektrometrisch vermessen. Die IC₅₀-Werte wurden durch lineare Regression ermittelt. In der Regel wurden vier Bestimmungen zu je acht Meßwerten durchgeführt.

5.4.5 Bestimmung des Selektivitätsindex

Der Selektivitätsindex (SI) ist definiert als das Verhältnis aus Zytotoxizität über der antiplasmodialen Aktivität und kann zur Beurteilung der Frage, inwieweit die antiplasmodiale Aktivität auf eine spezifische Hemmung des Malariaerregers zurückzuführen ist, herangezogen werden:

$$SI = \frac{\text{IC}_{50}\text{-Wert (Zytotoxizität)}}{\text{IC}_{50}\text{-Wert (antiplasmodiale Aktivität)}}$$

Bekannte Antimalariamittel wie zum Beispiel Artemisinin zeichnen sich durch einen SI-Wert von > 1000 aus, während allgemein toxische Substanzen Indices < 10 aufweisen (Likhitwitayawuid et al., 1993a).

5.5 Phytochemische Untersuchung von *Andira inermis*

5.5.1 Extraktion und Isolierung der Verbindungen 1-21

Es wurden jeweils die Blatt- und Zweigdrogen zweier Chargen von *A. inermis* untersucht. Das erste Untersuchungsmaterial wurde in Panama gesammelt, die zweite Ernte erfolgte in Ghana. Im Folgenden werden nacheinander die einzelnen Drogenproben behandelt.

5.5.1.1 Extraktion der Zweigdroge aus Panama

Die getrockneten und zerkleinerten Zweige (600 g) wurden dreimal mit je 2 l einer Mischung aus PE/EtOAc 1:1 (V/V) für 24 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert. Nach dem Entfernen der Lösemittel am Rotationsverdampfer (40 °C, WB) wurde der ölige Rückstand (3.3 g) über eine offene Kieselsäule (KG = 45 g; ID = 3 cm; l = 45 cm; FR = 1.5 ml/min) getrennt. Die Flußrate lag bei 5-10 ml/min, das Eluent setzte sich wie folgt zusammen:

1. 300 ml Cyclohexan
2. 300 ml Cyclohexan/EtOAc (9:1 [V/V])
3. 200 ml Cyclohexan/EtOAc (8:2 [V/V])
4. 300 ml Cyclohexan/EtOAc (7:3 [V/V])
5. 200 ml Cyclohexan/EtOAc (3:7 [V/V])
6. 200 ml Methanol

Nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchung (Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V] bzw. Cyclohexan/EtOAc 3:7 [V/V], Detektion: UV-Löschung bei 254 nm) wurde das Eluat zu insgesamt sieben Fraktionen vereinigt, die gegen *P. falciparum* getestet wurden. Die Fraktionen 4, 5 und 6 sollten phytochemisch untersucht werden, wobei nur Fraktion 6 eine schwache Aktivitätssteigerung (IC₅₀-Wert: 26.4 µg/ml [PoW]) verglichen mit dem Rohextrakt zeigte. Fraktion 4 und 5 zeigten Werte » 25 µg/ml.

Fraktion 4 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 8:2 [V/V]; 320 mg) war stark chlorophyllhaltig, so dass die geringe Aktivität eventuell durch die geringe Konzentration der zwei Hauptverbindungen zu erklären ist. Die Aufreinigung über präp. HPLC (isokratisch MeOH/H₂O 70:30 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A) führte zur Isolierung von Verbindung **17** (19 mg) und einem 1:3 Gemisch aus Verbindung **4** und **5**, das sich unter diesen Bedingungen nicht trennen ließ (s.u.).

Fraktion 5 (150 mg) wurde mit einem Mischungsverhältnis von Cyclohexan/EtOAc (8:2 [V/V]) von der Säule eluiert. Die Isolierung von **1** (2.4 mg), **4** (6.6 mg) und **5** (6.1 mg) erfolgte isokratisch (MeOH/H₂O 55:45 [V/V]; Nucleosil; Gerät A) über präp. HPLC bei einer Flußrate von 5 ml/min.

Fraktion 6 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V]; 170 mg) wurde ebenfalls mittels präp. HPLC (isokratisch MeOH/H₂O 55:45 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A) aufgereinigt. So konnten die Verbindungen **2** (8.3 mg), **3** (8.5 mg) und **6** (1.6 mg) gewonnen werden.

5.5.1.2 Extraktion der Blattdroge aus Panama

Die getrockneten und zerkleinerten Blätter (200 g) wurden dreimal mit je 1.5 l einer Mischung aus PE/EtOAc 1:1 (V/V) für 24 Stunden bei RT extrahiert. Nach dem Entfernen der Lösemittel am Rotationsverdampfer (40 °C; WB) wurde das Pflanzenmaterial erneut dreimal mit je 1 l einer Mischung aus MeOH/Wasser 8:2 (V/V) extrahiert. Nachdem der MeOH vollständig entfernt worden war, wurde die wässrige Phase (700 ml) fünfmal mit je 500 ml PE, viermal mit je 500 ml CHCl₃ und dreimal mit je 500 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die jeweils vereinigten und über Natriumsulfat getrockneten Phasen wurden im Vakuum zur Trockne einrotiert und dem *in-vitro*-Aktivitätstest gegen Dd2 zugeführt.

Der ölige Rückstand (5.2 g) aus dem lipophilen Extraktionsverfahren wurde über eine offene Kieselgelsäule (KG = 75 g; ID = 3 cm; l = 45 cm; FR = 3 ml/min) getrennt. Der Gradient aus Cyclohexan und EtOAc setzte sich wie folgt zusammen:

1. 900 ml Cyclohexan
2. 700 ml Cyclohexan/EtOAc 9:1 (V/V)
3. 700 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
4. 700 ml Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V/V)
5. 500 ml Cyclohexan/EtOAc 3:7 (V/V)
6. 500 ml Methanol

Nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchung (Cyclohexan/ EtOAc (7:3 [V/V]) bzw. Cyclohexan/ EtOAc 3:7 [V/V]; Detektion: UV-Löschung bei 254 nm) wurde das Eluat in insgesamt acht Fraktionen aufgeteilt. Nachdem diese im *in-vitro*-Test getestet wurden, stellte sich heraus, dass nur Fraktion 6 (30 mg; eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V]) eine ausreichende Aktivität aufwies (IC₅₀-Wert: 16.7 µg/ml [Dd2]). Die Isolierung von **1** (6.5 mg) und **14** (< 1mg) erfolgte isokratisch über präp. HPLC auf einer analytischen Säule (MeOH/Wasser 40:60 [V/V], FR = 1.5 ml/min; Eurospher; Gerät B). Obwohl Fraktion 7 (165 mg; eluiert mit Cyclohexan/ EtOAc 3:7 [V/V]) nur noch eine Aktivität von 38 µg/ml gegen PoW aufwies, wurde die Hauptverbindung isoliert, die als Verbindung **18** identifiziert werden konnte.

Aufgrund der folgenden Ergebnisse der Ausschüttelfractionen im *in-vitro*-Test wurde mit der CHCl₃-Phase (2 g) weitergearbeitet (IC₅₀-Werte):

PE-Phase:	61.8	µg/ml
CHCl ₃ -Phase:	20.3	µg/ml
EtOAc-Phase:	64.8	µg/ml
Wasser-Phase:	>100	µg/ml.

Es erfolgte zunächst eine chromatographische Trennung der CHCl₃-Fraktion über eine offene Kieselgelsäule (KG = 20 g; ID = 2 cm; l = 50 cm; FR = ca 1 ml/min). Der Gradient setzte sich diesmal aus CHCl₃ und MeOH zusammen:

1. 100 ml CHCl₃
2. 100 ml CHCl₃/MeOH 9:1 (V/V)
3. 100 ml CHCl₃/MeOH 8:2 (V/V)
4. 200 ml CHCl₃/MeOH 7:3 (V/V)
5. 200 ml CHCl₃/MeOH 3:7 (V/V).
6. 200 ml Methanol

Nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchung (EtOAc/H₂O/Ameisensäure 10:4:1 [V/V/V]; Detektion: UV-Löschung bei 254 nm und Besprühen mit Naturstoffreagenz) wurden sechs Fraktionen erhalten, von denen Fraktion 2, 3 und 4 aufgrund der *in-vitro*-Testergebnisse (IC₅₀-Werte: 5.6, 7.2 und 18.1 µg/ml [Dd2]) zur weiteren Aufarbeitung herangezogen wurden.

Die Fraktion 2 (eluiert mit CHCl₃/MeOH 9:1 [V/V]; 280 mg) stellte ein sehr komplexes Gemisch aus mehreren verwandten Naturstoffen dar. Sie wurde durch präp. HPLC (MeOH/Wasser 40:60, nach 45 min 70:30, nach 60 min 0:100 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) aufgereinigt und es konnten insgesamt sechs Peaks gewonnen werden, aus denen die folgenden Verbindungen eindeutig zuzuordnen waren. Peak 1 (R_t = 14.6 min) stellte sich als Carotinoidabbauprodukt **21** heraus, während Peak 2 (R_t = 28.4 min; 1.5 mg) mit Hilfe von Vergleichsspektren als **2** identifiziert werden konnte. In Peak 3 (R_t = 38.5 min) lag neben leichten Verunreinigungen Verbindung **1** (8 mg) vor. Aus Peak 4 (R_t = 41.5 min) wurden präparativ auf einer analytischen Säule (MeOH/Wasser 50:50, nach 20 min 60:40, nach 30 min 0:100 [V/V], FR = 1.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) die Verbindungen **15** (1 mg) und **7** (1.5 mg) gewonnen. Durch präp. DC (CHCl₃/Aceton/Ameisensäure (9:2:1 [V/V/V])) konnten in Peak 5 (R_t = 45.7 min) **5** (ca 1.5 mg) nachgewiesen und 7 mg von **18** isoliert werden. Peak 6 (R_t = 48.5 min) konnte als Verbindung **13** (7 mg) identifiziert werden.

Fraktion 3 (eluiert mit CHCl₃/MeOH 8:2 [V/V]; 460 mg) wurde wie Fraktion 2 über präp. HPLC (MeOH/Wasser 40:60, nach 45 min 70:30, nach 60 min 0:100 [V/V], FR = 5.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) gereinigt und es konnte als Hauptverbindung **10** (22 mg) gewonnen werden. Für die Strukturaufklärung wurde **10** nochmals über präp. DC (CHCl₃/Aceton/Ameisensäure 9:2:1 [V/V/V]; R_f-Wert: 0.21) gereinigt.

Aus Fraktion 4 (eluiert mit CHCl₃/MeOH 7:3 [V/V]; 550 mg) konnten isokratisch mittels präp. HPLC (MeOH/Wasser 45:55 [V/V], FR = 5.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) **9** (6.7 mg) und **10** (9.2 mg) isoliert werden.

5.5.1.3 Extraktion der Zweigdroge aus Ghana

Es standen 400 g Zweigdroge zur Verfügung, die fünfmal mit 1.5 l einer Mischung aus MeOH und Wasser 8:2 (V/V) bei RT extrahiert wurden. Nach Abziehen des MeOH-Anteils am Rotationsverdampfer (40 °C, WB) verblieben 500 ml wässriger Extrakt. Anschließend wurde die wässrige Phase viermal mit je 300 ml PE, dreimal mit je 300 ml CHCl₃ und viermal mit je 300 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum (40 °C, WB) zur Trockne einrotiert und auf ihre Aktivität gegen *P. falciparum* (PoW) getestet. Die IC₅₀-Werte sind im Folgenden angegeben:

PE-Phase:	21.8	µg/ml
CHCl ₃ -Phase:	5.7	µg/ml
EtOAc-Phase:	41.8	µg/ml.

Zur weiteren Aufarbeitung wurde die CHCl₃-Phase (2 g) herangezogen und zunächst über eine Kieselgelsäule (KG = 35 g; ID = 4 cm; FH = 14 cm; FR = 1 ml/min) getrennt. Der Gradient setzte sich wie folgt zusammen:

1. 200 ml CHCl₃
2. 200 ml CHCl₃/MeOH (9:1 [V/V])
3. 100 ml CHCl₃/MeOH (8:2 [V/V])
4. 50 ml CHCl₃/MeOH (7:3 [V/V])
5. 200 ml MeOH

Nach dünnstschichtchromatographischer Untersuchung (Cyclohexan/EtOAc 3:7 [V/V]; Detektion: UV-Löschung bei 254 nm und Besprühen mit Naturstoffreagenz) wurden die Eluate in 5 Fraktionen vereinigt. Der *in-vitro*-Test ergab, dass Fraktion 3 (eluiert mit CHCl₃/MeOH 9:1 [V/V]; 500 mg) noch eine Aktivität von 11.7 µg/ml (Dd2) aufwies. Nach mehreren Versuchen erwies sich ein Gradient aus Toluol/CHCl₃/Aceton am günstigsten für eine zweite Trennung über Kieselgel (KG = 10 g; ID = 1.5 cm; l = 60 cm; FR = 1-1.5 ml/min):

1. 120 ml Toluol/CHCl₃/Aceton 25:25:5 (V/V/V)
2. 120 ml Toluol/CHCl₃/Aceton 25:25:10 (V/V/V)
3. 140 ml Toluol/CHCl₃/Aceton 25:25:20 (V/V/V)
4. 200 ml Toluol/CHCl₃/Aceton 40:25:35 (V/V/V) .

Die Kontrolle über DC erfolgte mit Toluol/CHCl₃/Aceton 40:25:35 (V/V/V). Die Trennung ergab insgesamt 7 Fraktionen, von denen die Fraktionen 3.1, 3.2 und 3.3 zur weiteren Aufarbeitung herangezogen wurden. Fraktion 3.1 wurde durch präp. HPLC (FR = 5.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) mit einem Gradienten (MeOH/Wasser 65:35, nach 50 min 80:20 [V/V]) aufgereinigt. Es konnten erneut die Verbindungen **4** (0.85 mg), **5** (1.24 mg) und **6** (< 1 mg) isoliert werden. Zusätzlich konnte in der Fraktion Substanz **11** nachgewiesen werden. Fraktion 3.2 und 3.3 wurden isokratisch (MeOH/Wasser 70:30 [V/V]) mit Hilfe der präp. HPLC (FR = 5.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) aufgereinigt. Aus 3.2 konnte die Substanz **3** (2 mg) isoliert und mit Hilfe von Vergleichsspektren **11**, **2** und **6** identifiziert werden (< 1mg). Die Aufreinigung von 3.3 lieferte erneut Verbindung **2** und ein Gemisch aus **2**, **1** und **6**.

5.5.1.4 Extraktion der Blattdroge aus Ghana

Es standen 420 g Blattdroge zur Verfügung, die fünfmal mit 1.5 l eines MeOH-Wasser-Gemisches (8:2 [V/V]) bei RT extrahiert wurden. Nach Abziehen des MeOH-Anteils am Rotationsverdampfer (40 °C, WB) verblieben 900 ml wässriger Extrakt. Anschließend wurde die wässrige Phase viermal mit je 500 ml PE, neunmal mit je 500 ml CHCl₃ und fünfmal mit je 500 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum (40 °C, WB) zur Trockne einrotiert und auf ihre Aktivität gegen *P. falciparum* (Dd2) getestet. Die IC₅₀-Werte sind im Folgenden angegeben:

PE-Phase:	28.3 µg/ml
CHCl ₃ -Phase:	10.6 µg/ml
EtOAc-Phase:	44.7 µg/ml.

Zur weiteren Aufarbeitung wurde die CHCl₃-Phase (3.4 g) herangezogen und zunächst über eine Kieselgelsäule (KG = 50 g; ID = 3 cm; l = 45 cm; FR = 1.5 ml/min) getrennt.

Der Gradient setzte sich wie folgt zusammen:

1. 150 ml CHCl_3
2. 100 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 (V/V)
3. 100 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 (V/V)
4. 200 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 (V/V)
5. 100 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:3 (V/V)
6. 400 ml MeOH.

Nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchung (Cyclohexan/EtOAc 3:7 [V/V]; Detektion: UV-Löschung bei 254 nm und Besprühen mit Naturstoffreagenz) wurden die Eluate in 7 Fraktionen vereinigt. Der *in-vitro*-Test gegen *P. falciparum* (PoW) ergab folgendes Ergebnis (IC_{50} -Werte):

Fraktion 1	19.7	$\mu\text{g/ml}$
Fraktion 2	20.0	$\mu\text{g/ml}$
Fraktion 3	4.2	$\mu\text{g/ml}$
Fraktion 4	8.0	$\mu\text{g/ml}$
Fraktion 5	19.5	$\mu\text{g/ml}$
Fraktion 6	32.0	$\mu\text{g/ml}$
Fraktion 7	≈ 100	$\mu\text{g/ml}$.

Aus Fraktion 3 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 9:1 [V/V]; 190 mg) konnten durch präp. HPLC (MeOH/Wasser 30:70, nach 40 min 70:30; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A) drei Hauptpeaks (3.1-3.3) gewonnen werden, die sich aber bei einer Kontrolle mittels analyt. HPLC und $^1\text{H-NMR}$ als Gemische herausstellten. Aus 3.1 ließ sich Substanz **16** (1 mg) durch präp. DC (Cyclohexan/EtOAc 3:7 [V/V]; R_f -Wert: 0.35) sauber isolieren. Zusätzlich konnte Verbindung **12** (R_f -Wert: 0.49; 1.5 mg) durch Vergleichsspektren aufgeklärt werden. Beim Eintrocknen der Fraktion 3.2 fielen aus der methanolischen Lösung Kristalle aus, die als Substanz **18** identifiziert werden konnten. Um die Ausbeute für die Strukturaufklärung zu erhöhen, wurde diese Fraktion ebenfalls durch präp. DC (Cyclohexan/EtOAc 3:7 [V/V]) gereinigt. Die erste Bande (R_f -Wert: 0.37) stellte sich als Hauptverbindung **18** heraus, zudem konnte in Bande 2 (R_f -Wert: 0.41) ein Gemisch aus **13** und **14** nachgewiesen werden. Die Hauptverbindung aus 3.3 konnte eindeutig durch Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der Verbindung **13** zugeordnet werden. Aus der Ausgangsfraktion 3 konnte als Nebenverbindung Anisaldehyd (**20**) identifiziert werden konnte.

Fraktion 4 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 8:2 [V/V]; 420 mg) wurde zunächst auf einer geschlossenen RP-18-Säule durch MPLC (ID = 3 cm; FH = 7-10 cm; l = 32 cm; FR = 5-6 ml/min) mit einem MeOH/Wasser-Gradienten vorgetrennt:

1. Fraktion 200 ml MeOH/Wasser 3:7 (V/V)
2. Fraktion 200 ml MeOH/Wasser 3:7 (V/V)
3. Fraktion 200 ml MeOH/Wasser 5:5 (V/V)
4. Fraktion 200 ml MeOH/Wasser 7:3 (V/V)
5. Fraktion 300 ml MeOH.

Dabei entsprach jedes aufgetragene Volumen einer Fraktion. Erneut konnte in der vierten Fraktion (350 mg) eine Aktivität gegen *P. falciparum* nachgewiesen werden (4.7 µg/ml [PoW]), die daraufhin über eine offene Kieselgelsäule (KG = 10 g; ID = 1.5 cm; l = 60 cm; FR = 1 ml/min) erneut getrennt wurde. Zusammensetzung des Gradienten:

1. 150 ml CHCl₃
2. 100 ml CHCl₃/MeOH 99:1 (V/V)
3. 100 ml CHCl₃/MeOH 95:5 (V/V)
4. 100 ml CHCl₃/MeOH 9:1 (V/V)
5. 50 ml CHCl₃/MeOH 8:2 (V/V)
6. 600 ml MeOH.

Die Kontrolle erfolgte über DC mit dem Fließmittelgemisch CHCl₃/MeOH 95:5 (V/V). Insgesamt konnten 7 Fraktionen (4.4.1-4.4.7) gewonnen werden. In Fraktion 4.4.2 (eluiert mit CHCl₃/MeOH (99:1 [V/V])) konnte mit Hilfe des ¹H-NMR-Spektrums Verbindung **18** nachgewiesen werden, während aus Fraktion 4.4.3 (eluiert mit CHCl₃/MeOH 99:1 [V/V] und CHCl₃/MeOH 95:5 [V/V]) durch präp. DC (CHCl₃/MeOH 95:5 [V/V]) neben **18** (R_f-Wert: 0.51) zusätzlich die verwandte Verbindung **19** (R_f-Wert: 0.46) isoliert werden konnte.

5.5.2 Herstellung und Aufarbeitung des Milchextraktes

Es wurden 30 g getrocknete und pulverisierte Droge (Ernte aus Panama) zweimal mit 300 ml im Handel erhältlicher Biomilch (pasteurisiert, aber nicht homogenisiert; Fettgehalt mindestens 3.8 %) aufgekocht und 10 min. köcheln gelassen. Nach Filtration (unter Vakuum) wurden 30 ml Rohextrakt eingefroren, um später mittels Gefriertrocknung die Probe für den *in-vitro*-Test vorzubereiten. Insgesamt wurden 250 ml beige-farbiger Milchextrakt nach einem allgemein gültigen Verfahren der Lebensmittelanalytik (Matissek et al., 1989) aufgearbeitet. Prinzip der Methode nach Röse-Gottlieb ist es, die Eiweißstoffe durch die Behandlung mit Ammoniak aufzuschließen und das freigesetzte Fett zu extrahieren. Anschließend sollten mit Hilfe von HPLC und ¹H-NMR mögliche extrahierte Inhaltsstoffe aus *A. inermis* nachgewiesen werden. Zu dem Milchextrakt wurden 50 ml 25 %ige Ammoniaklösung gegeben und gemischt. Nach dem Abkühlen wurden 600 ml Ethanol (96 %) und 600 ml Diethylether hinzugegeben. Die Mischung wurde ca. 5 min. geschüttelt und anschließend mit zusätzlichen 600 ml PE erneut geschüttelt. Nach vollständiger Phasentrennung wurde die obere Phase abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und die organischen Lösemittel am Rotationsverdampfer (40°C, WB) entfernt. Der Vorgang wurde mit je 300 ml Diethylether und PE wiederholt. Der Fettrückstand (PE-Phase) wurde mit MeOH im Ultraschallbad dispergiert und der in MeOH-lösliche Anteil abdekantiert. Der Rückstand war in CHCl₃ löslich. Im HPLC-Spektrum (Wasser/MeOH 50:50, nach 20 min 20:80, nach 30 min 1:99 [V/V]; FR = 1.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) konnten aus diesen Fraktionen keine charakteristischen Merkmale der Isoflavone nachgewiesen werden. Das gleiche galt für die Auswertung mittels ¹H-NMR-Spektren. Der einrotierte Rückstand der wässrigen Phase wurde mit Aceton aufgenommen und von dem in Aceton löslichen Anteil nach Abziehen des Lösemittels ebenfalls ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen. Um noch störende Bestandteile aus dieser Fraktion zu entfernen, wurde diese über eine

geschlossene RP-18-Säule mittels MPLC (ID = 3 cm; l = 32 cm; FH = 7-10 cm; FR = 5-6 ml/min) gereinigt:

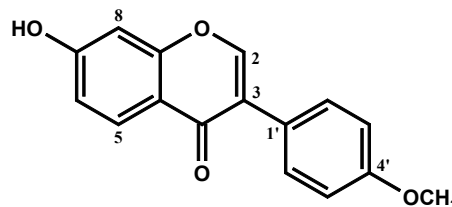
1. 20 ml Wasser
2. 30 ml Wasser/MeOH 5:5 (V/V)
3. 40 ml MeOH

Im ^1H -NMR-Spektrum der 2. Fraktion konnten im aromatischen Bereich die charakteristischen Signale eines oder mehrerer Isoflavone nachgewiesen werden. Die Retentionszeiten (zwei Peaks bei 1222 und 1298 s) aus dem HPLC-Chromatogramm (Wasser/MeOH 50:50, nach 20 min 20:80, nach 30 min 1:99 [V/V]; FR = 1.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) entsprachen keiner der bekannten Verbindungen.

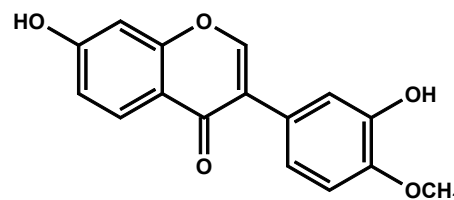
5.5.3 Strukturaufklärung der Isoflavone 1-7

Eigenschaften von Formononetin (1)

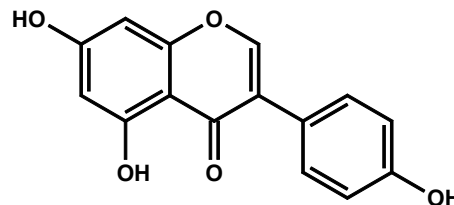
7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavon



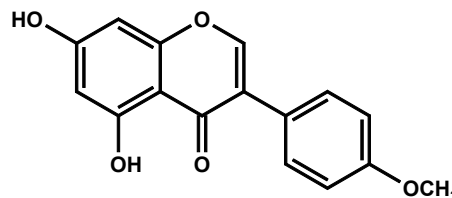
Menge:	2.4 mg
Eigenschaften:	schwachgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (2:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.38
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: türkis
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 1) 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 673 s; Gerät A 2) Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 648 s; Gerät B
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	200, 248, 301
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	268 [M] ⁺ (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	3.83 (3H, s, 4'-OCH ₃), 6.86 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.95 (1H, dd, J = 2.2 und 8.8 Hz, H-6), 6.98 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3'/5'), 7.47 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2'/6'), 8.06 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 8.15 (1H, s, H-2)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: > 50 μg/ml [PoW]; > 50 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Calycosin (2)*3',7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon*

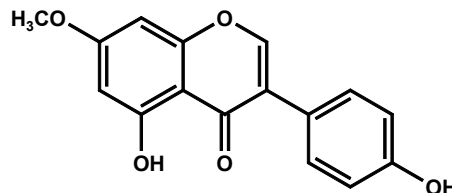
Menge:	8.3 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (2:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.39
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm)
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 434 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	202, 251, 281
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	284 [M] ⁺ (100), 269 [M-CH ₃] ⁺ (25), 241 [M - CH ₃ - CO] ⁺ (17), 213 (24), 148 (7), 137 (26), 133 (17)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	3.88 (3H, s, 4'-OCH ₃), 6.91 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.98 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'), 7.00 (1H, dd, J = 2.2 und 8.8 Hz, H-6), 7.07 (1H, dd, J = 2.1 und 8.3 Hz, H-6'), 7.17 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 8.07 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 8.15 (1H, s, H-2)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 4.2 μg/ml [PoW]; 9.8 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Genistein (3)*4',5,7-Trihydroxyisoflavin*

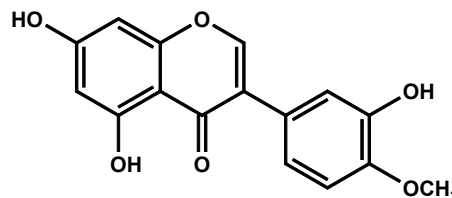
Menge:	8.5 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (2:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.39
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: grün
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 527 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	198, 260
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	270 [M] ⁺ (100), 153 (49), 152 (23), 124 (13), 118 (18), 96 (6), 69 (16)
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	6.22 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 6.34 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.84 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3'/5'), 7.37 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2'/6'), 8.06 (1H, s, H-2)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	6.32 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.47 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.91 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3'/5'), 7.46 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2'/6'), 8.16 (1H, s, H-2), 13.02 (1H, s, 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 2.0 μg/ml [PoW]; 4.1 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Biochanin A (4)*5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon*

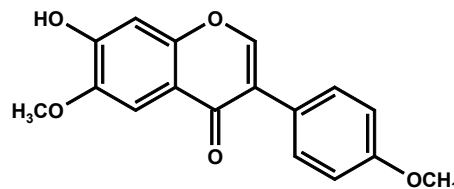
Menge:	6.6 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (2:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.5
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: gelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ / MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 877 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	197, 260
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	284 [M] ⁺ (100), 269 (17), 152 (17), 133 (12), 132 (53), 124 (8), 117 (11)
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	3.83 (3H, s, 4'-OCH ₃), 6.22 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 6.35 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.98 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3'/5'), 7.47 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2'/6'), 8.08 (1H, s, H-2)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	3.84 (3H, s, 4'-OCH ₃), 6.35 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 6.45 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 7.00 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3'/5'), 7.55 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2'/6'), 8.20 (1H, s, H-2), 13.00 (1H, s, 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 46.8 μg/ml [PoW]; > 50 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Prunetin (5)*4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavon*

Menge:	6.1 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (2:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.5
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: grün
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 856 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	197, 260
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	284 [M] ⁺ (100), 255 (8), 167 (35), 166 (35), 138 (22), 118 (15), 110 (9), 95 (13)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	3.93 (3H, s, 7-OCH ₃), 6.36 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 6.55 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.91 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3'/5'), 7.47 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2'/6'), 8.22 (1H, s, H-2), 12.99 (1H, s, 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 27.8 μg/ml [PoW]; > 50 μg/ml [Dd2]

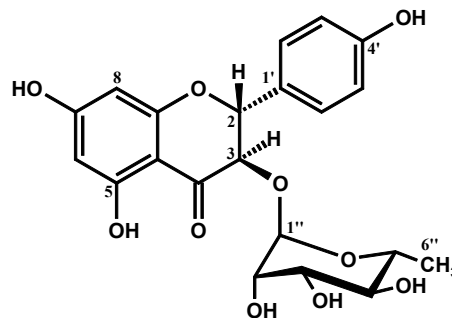
Eigenschaften von Pratensein (6)*4'-Methoxy -3',5,7-trihydroxyisoflavon*

Menge:	1.6 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (2:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.37
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: grün
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 566 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	197, 260
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	300 [M] ⁺ (100), 272 (10), 257 (17), 229 (13), 153 (25), 148 (13), 120 (17)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	3.86 (3H, s, 4'-OCH ₃), 6.29 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.43 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 7.00 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'), 7.05 (1H, dd, J = 2.1 und 8.3 Hz, H-6'), 7.13 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 8.17 (1H, s, H-2), 13.00 (1H, s, 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 45.0 μg/ml [PoW]; > 50 μg/ml [Dd2]

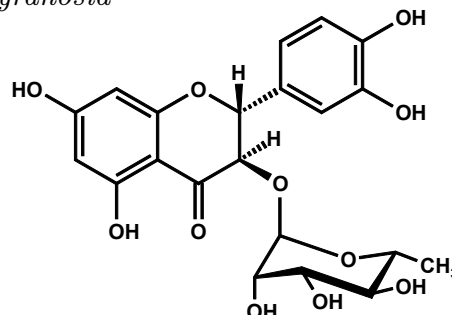
Eigenschaften von Afrormosin (7)*4',6-Dimethoxy-7-hydroxyisoflavin*

Menge:	1.5 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Nadeln
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /Aceton/Ameisensäure (9:2:1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.21
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm)
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 40:60, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1092 s; Gerät B
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	207, 258, 320
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	298 [M] ⁺ (100), 283 [M-CH ₃] ⁺ (15), 267 [M-OCH ₃] ⁺ (4), 166 (32)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	3.83 (3H, s, 4'-OCH ₃), 3.97 (3H, s, 6-OCH ₃), 6.97 (1H, s, H-8), 6.98 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3'/5') 7.56 (1H, s, H-5), 7.57 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2'/6'), 8.18 (1H, s, H-2)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	3.85 (3H, s, 4'-OCH ₃), 4.01 (3H, s, 6-OCH ₃), 6.97 (1H, s, H-8), 6.97 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3'/5') 7.50 (1H, s, H-5), 7.65 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2'/6'), 7.92 (1H, s, H-2)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 11.8 μg/ml [PoW]; > 50 μg/ml [Dd2]

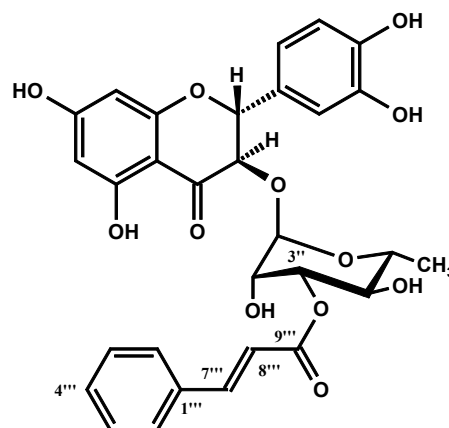
5.5.4 Strukturaufklärung der Flavanonolglykoside 8-10

Eigenschaften von Dihydrokämpferol-3-*O*-rhamnosid (8; Engelitin)*4',5,7-Trihydroxyflavanonol-3-O-rhamnopyranosid*

Menge:	9.2 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/H ₂ O/Ameisensäure (10:4:1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.49
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: gelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 446 s; Gerät A
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	201, 224 (Schulter), 292
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	272 [M-Rhamnose] ⁺ (1), 124 (20), 94 (30), 44 (100)
(+)-FAB-MS, m/z:	435 [M+H] ⁺ , 457 [M+Na] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	433 [M-H] ⁻
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	1.14 (3H, d, J = 6.2 Hz, 6''-CH ₃), 3.32 (1H, t, J = 9.6 Hz, H-4''), 3.57 (1 H, m, H-3''), 3.63 (1 H, m, H-2''), 4.01 (1H, brs, H-1''), 4.22 (1 H, m, H-5''), 4.71 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-3), 5.25 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-2), 5.98 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.00 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.91 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3'/5'), 7.43 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2'/6'), 11.93 (1H, s, 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: > 50 μg/ml [PoW]; > 50 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Taxifolin-3-O-rhamnosid (9; Astilbin)*3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanonol-3-O-rhamnopyranosid*

Menge:	6.7 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/H ₂ O/Ameisensäure (10:4:1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.41
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: orange-rot
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 342 s; Gerät A
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	208, 231 (Schulter), 289
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	288 [M-Rhamnose] ⁺ (0.5), 154 (15), 137 (11), 124 (26), 94 (27), 44 (100)
(+)-FAB-MS, m/z:	451 [M+H] ⁺ , 473 [M+Na] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	449 [M-H] ⁻
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	1.15 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.2 Hz, 6''-CH ₃), 3.38 - 3.70 (<i>m</i> , H-2'', 3'', H-4''), 4.12 (1H, <i>brs</i> , H-1''), 4.21 (1 H, <i>m</i> , H-5''), 4.67 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10.6 Hz, H-3), 5.18 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10.6 Hz, H-2), 5.97 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.1 Hz, H-6), 5.99 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.1 Hz, H-8), 6.86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, H-5'), 6.91 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2.1 und 8.2 Hz, H-6'), 7.06 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.1 Hz, H-2'), 11.93 (1H, <i>s</i> , 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: ~ 50 μg/ml [PoW]; > 50 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von 3''-O-trans-Cinnamoylastilbin (10)*3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanonol-3-O-(3''-O-trans-cinnamoyl)-rhamnopyranosid*

Menge:	22 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /Aceton/Ameisensäure (9:2:1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.21
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm)
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 342 s; Gerät A
Summenformel:	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₂
[α] _D ²⁰ :	+ 1.29° (Aceton, c 0.22)
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	207, 288
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	Fragmente nicht zuzuordnen
(+)-FAB-MS, m/z:	603 [M+Na] ⁺ , 625 [M+2Na] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	579 [M-H] ⁻
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.3 (Seite 38)
¹³ C-NMR (125 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.3 (Seite 38)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 9.1 μg/ml [PoW]; 3.9 μg/ml [Dd2]

5.5.5 Strukturaufklärung der Flavanone 11-12

Eigenschaften von Naringenin (11)

4',5,7-Trihydroxyflavanon

Menge:

<1 mg

Eigenschaften:

schwachgelber Feststoff

Chromatographische Parameter:

DC-System: KG 60 F₂₅₄; Cyclohexan/EtOAc (3:7 [V/V]; KS); R_f-Wert: 0.53

Detektion:

schwachgelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminde-
rung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen
mit Naturstoffreagenz: zitronengelb

HPLC-System:

Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm;
0.5% H₃P O₄/MeOH (50:50, nach 20 min. 20:80, nach 30
min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R_t = 386 s; Gerät A

Summenformel:

C₁₅H₁₂O₅

UV (MeOH), λ_{max} (nm):

220, 290

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:

272 [M]⁺ (48), 153 (100), 120 (35)

¹H-NMR (400 MHz, AcetonD₆),
δ (ppm):

2.73 (1H, dd, J = 3.0 und 17.0 Hz, H-3b), 3.19 (1H, dd,
J = 13.0 und 17.0 Hz, H-3a), 5.46 (1H, dd, J = 3.0 und
13.0 Hz, H-2), 5.95 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 5.96 (1H,
d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.89 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3'/5'),
7.39 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2'/6'), 12.17 (1H, s, 5-OH)

Antiplasmodiale Aktivität:

IC₅₀-Wert: 43.8 μg/ml [PoW]; 15.9 μg/ml [Dd2]
(vermessen wurde die Referenzsubstanz)

Eigenschaften von Sakuranetin (12)

4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavanon

Menge:

1 mg

Eigenschaften:

schwachgelber Feststoff

Summenformel:

C₁₆H₁₄O₅

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:

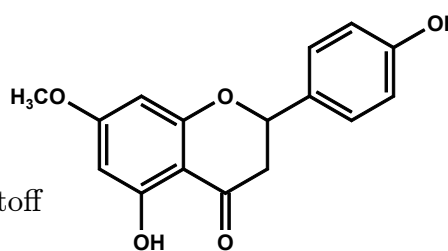
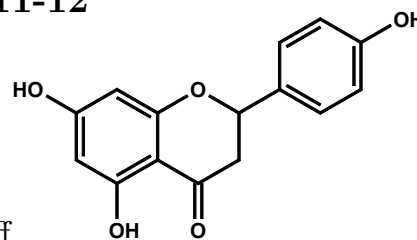
286 [M]⁺ (67), 193 (28), 167 (100), 166 (26), 120 (29)

¹H-NMR (400 MHz, AcetonD₆),
δ (ppm):

2.70 (1H, dd, J = 3.0 und 17.0 Hz, H-3b), 3.22 (1H, dd,
J = 13.0 und 17.0 Hz, H-3a), 3.85 (3H, s, 7-OCH₃), 5.49
(1H, dd, J = 3.0 und 13.0 Hz, H-2), 6.04 (1H, d, J =
2.2 Hz, H-8), 6.04 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.90 (2H, d,
J = 8.5 Hz, H-3'/5'), 7.40 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2'/6'),
12.37 (1H, s, 5-OH)

Antiplasmodiale Aktivität:

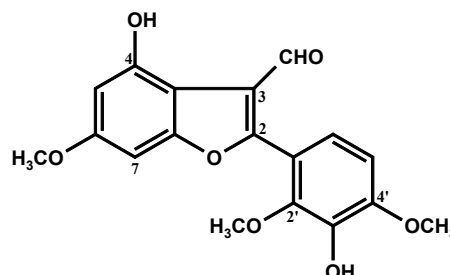
IC₅₀-Wert: n.b.



5.5.6 Strukturaufklärung der 2-Arylbenzofurane 13-16

Eigenschaften von Andinermal A (13)

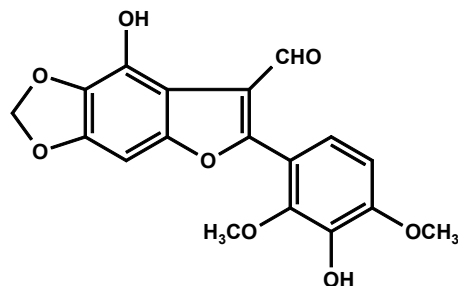
2-[2',4'-Dimethoxy-3'-hydroxyphenyl]-4-hydroxy-6-methoxy-benzofuran-3-carbaldehyd



Menge:	7 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /Aceton/Ameisensäure (9:2:1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.63
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: dunkelgelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ P O ₄ /MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 784 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₆ O ₇
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	212, 265, 340
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	344 [M] ⁺ (100), 329 [M-CH ₃] ⁺ (5), 313 [M-OCH ₃] ⁺ (68)
(+)-FAB-MS, m/z:	345 [M+H] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	343 [M-H] ⁻
HR-MS, m/z, 80 eV:	344.08948 (C ₁₈ H ₁₆ O ₇ , berechnet für 344.08961), 313.07150 (C ₁₇ H ₁₃ O ₆ , berechnet für 313.07122)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.5 (Seite 43)
¹³ C-NMR (125 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.4 (Seite 41)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 2.1 μg/ml [PoW]; 3.9 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Andinermal B (14)

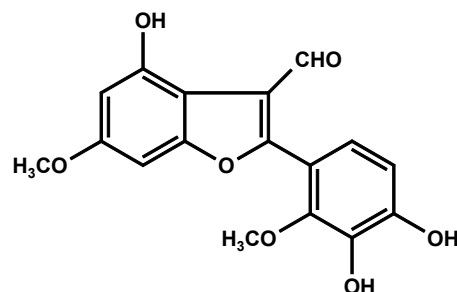
2-[2',4'-Dimethoxy-3'-hydroxyphenyl]-4-hydroxy-5,6-methylenedioxy-benzofuran-3-carbaldehyd



Menge:	<1 mg
Eigenschaften:	hellgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /Aceton/Ameisensäure (9:2:1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.62
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: negativ
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 864 s; Gerät B
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₄ O ₈
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	222, 262, 355
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	358 [M] ⁺ (96), 327 [M-OCH ₃] ⁺ (100), 312 [M-OCH ₃ -CH ₃] ⁺ (19)
HR-MS, m/z, 80 eV:	358.06900 (C ₁₈ H ₁₄ O ₈ , berechnet für 358.06887)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.5 (Seite 43)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: n.b.

Eigenschaften von Andinermal C (15)

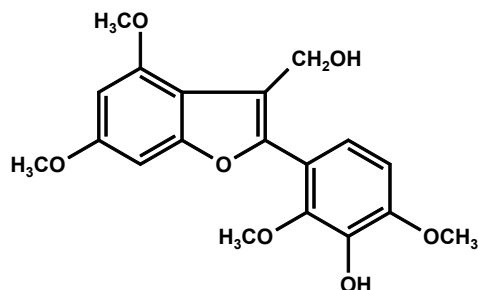
2-[3',4'-Dihydroxy-2'-methoxyphenyl]-4-hydroxy-6-methoxy-benzofuran-3-carbaldehyd



Menge:	1 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /Aceton/Ameisensäure (9:2:1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.46
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: bläulich
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 40:60, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1200 s; Gerät B
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	212, 260, 326
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	330 [M] ⁺ (100), 315 [M-CH ₃] ⁺ (9), 312 [M-H ₂ O] ⁺ (10), 299 [M-OCH ₃] ⁺ (57), 298 [M-CH ₃ OH] ⁺ (24)
HR-MS, m/z, 80 eV:	330.07531 (C ₁₇ H ₁₄ O ₇ , berechnet für 330.07395)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.5 (Seite 43)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 5.8 μg/ml [PoW]; 6.0 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Andinermol (16)

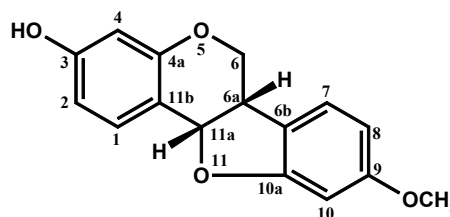
2-[2',4'-dimethoxy-3'-hydroxyphenyl]-4,6-dimethoxy-3-hydroxymethyl-benzofuran



Menge:	1 mg
Eigenschaften:	hellgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; Cyclohexan/EtOAc (3:7 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.35
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: bläulich
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 636 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₉ H ₂₀ O ₇
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	215, 292
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	360 [M] ⁺ (100), 342 [M - H ₂ O] ⁺ (10)
HR-MS, m/z, 80 eV:	360.12078 (C ₁₉ H ₂₀ O ₇ , berechnet für 360.12091)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.5 (Seite 43)
¹³ C-NMR (500 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.4 (Seite 41)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 8.6 μg/ml [PoW]; 13.7 μg/ml [Dd2]

5.5.7 Strukturaufklärung der Pterocarpane 17-19

Eigenschaften von Medicarpin (17)

3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan

Menge: 19 mg

Eigenschaften: hellgelbe Kristalle

Chromatographische Parameter: DC-System: KG 60 F₂₅₄; EtOAc/Cyclohexan (3:7 [V/V]; KS); R_f-Wert: 0.26

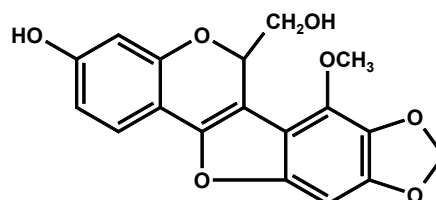
Detektion: gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: gelb-grün

HPLC-System: Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H₃PO₄/MeOH (50:50, nach 20 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R_t = 514 s; Gerät ASummenformel: C₁₆H₁₄O₄UV (MeOH), λ_{max} (nm): 208, 228 (Schulter), 284EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 270 [M]⁺ (100), 255 [M - CH₃]⁺ (27), 148 (11)(+) -FAB-MS, m/z: 271 [M+H]⁺(-) -FAB-MS, m/z: 269 [M-H]⁻HR-MS, m/z, 80 eV: 270.08844 (C₁₆H₁₄O₄, berechnet für 270.08921), 255.06571 (C₁₅H₁₁O₄, berechnet für 255.06574)

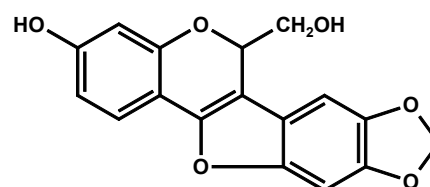
¹H-NMR (400 MHz, AcetonD₆), δ (ppm): 3.59 (2H, m, H-6, H-6a), 3.75 (3H, s, 4'-OCH₃), 4.27 (1H, dd, J = 10.5 und 16.0 Hz, H-6'), 5.51 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-11a), 6.36 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 6.38 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-10), 6.45 (1H, dd, J = 2.2 und 8.2 Hz, H-8), 6.56 (1H, dd, J = 2.4 und 8.4 Hz, H-2), 7.22 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-7), 7.32 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-1)

¹³C-NMR (100.6 MHz, AcetonD₆), δ (ppm): 40.4 (C-6a), 55.7 (9-OCH₃), 67.1 (C-6), 79.5 (C-11a), 97.2 (C-10), 103.9 (C-4), 106.9 (C-8), 110.4 (C-2), 112.8 (C-11b), 120.4 (C-6b), 125.8 (C-7), 133.1 (C-1), 157.7 (C-4a), 159.7 (C-3), 161.0 (C-9), 162.0 (C-10a)

Antiplasmodiale Aktivität: IC₅₀-Wert: 15.0 μg/ml [PoW]; 28.2 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Andiol A (18)*3-Hydroxy-7-methoxy-8,9-methylenedioxy-6-hydroxymethylpterocarpen*

Menge:	8 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; Cyclohexan/EtOAc (3:7 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.37; CHCl ₃ /MeOH (95:5 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.51
Detektion:	schwach gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminde- rung (254 nm)
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 796 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₄ O ₇
[α] _D ²⁰ :	+ 5.33° (CHCl ₃ , c 0.075)
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	215, 292
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	342 [M] ⁺ (92), 324 [M - H ₂ O] ⁺ (100), 313 (53), 309 (40)
(+)-FAB-MS, m/z:	343 [M+H] ⁺ ; 342 [M] ⁺ ; 325 [M - H ₂ O + H] ⁺
(-)-FAB-MS, m/z:	341 [M-H] ⁻
HR-MS, m/z, 80 eV:	342.07368 (C ₁₈ H ₁₄ O ₇ , berechnet für 342.07396)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.6 (Seite 51)
¹³ C-NMR (100.6 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	siehe siehe Tabelle 2.6 (Seite 51)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 15.0 μg/ml [PoW]; 42.5 μg/ml [Dd2]

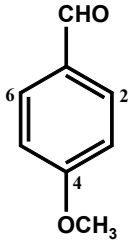
Eigenschaften von Andiol B (19)*3-Hydroxy-8,9-methylenedioxy-6-hydroxymethylpterocarpin*

Menge:	< 1 mg
Eigenschaften:	hellgelbe Kristalle
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /MeOH (95:5 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.46
Detektion:	schwach gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminde- rung (254 nm)
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 755 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₂ O ₆
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	n.b.
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	312 [M] ⁺ (31), 294 [M - H ₂ O] ⁺ (43), 167 (20), 149 (49), 28 (100)
HR-MS, m/z, 80 eV:	312.06352 (C ₁₇ H ₁₂ O ₆ , berechnet für 312.06339) 294.05271 (C ₁₇ H ₁₀ O ₅ , berechnet für 294.05283)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.6 (Seite 51)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: n.b.

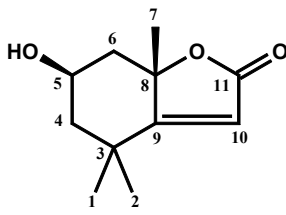
5.5.8 Strukturaufklärung weiterer Substanzen 20-21

Eigenschaften von Anisaldehyd (20)

4-Methoxybenzaldehyd

Menge:	n.b.	
Eigenschaften:	schwachgelbes Öl	
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; $R_t = 156$ s; Gerät B	
Summenformel:	$C_8H_8O_2$	
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	220, 284	
1H -NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	3.92 (3H, s, 4-OCH ₃), 7.00 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3/5), 7.79 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2/6), 9.84 (1H, s, CHO)	
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: n.b.	

Eigenschaften von Loliolid (21)

Menge:	5 mg	
Eigenschaften:	gelbliches Öl	
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 20 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; $R_t = 182$ s; Gerät A	
Summenformel:	$C_{11}H_{14}O_3$	
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	208	
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	196 [M] ⁺ (10), 178 [M - H ₂ O] ⁺ (25), 43 (100)	
1H -NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	1.27 (3H, s, 2-CH ₃) ^a , 1.47 (3H, s, 1-CH ₃) ^a , 1.54 (1H, dd, $J = 3.0$ und 14.0 Hz, H-4 _{ax}) ^b , 1.72 (1H, dd, $J = 3.0$ und 14.0 Hz, H-6 _{ax}) ^b , 1.74 (3H, s, 7-CH ₃), 1.99 (1H, dt, $J =$ 3.0 und 14.0 Hz, H-4 _{eq}) ^c , 2.39 (1H, dt, $J = 3.0$ und 14.0 Hz, H-6 _{eq}) ^c , 4.29 (1H, t, $J = 3.0$ Hz, H-5), 5.68 (1H, s, H-10)	
	^a , ^b , ^c Werte austauschbar	
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: >50 μ g/ml [PoW]; >50 μ g/ml [Dd2]	

5.6 Phytochemische Untersuchung von *Artemisia afra*

5.6.1 Extraktion und Isolierung der Verbindungen 22-37

Zur Untersuchung von *Artemisia afra* wurden 350 g getrocknete und zerkleinerte Krautdroge herangezogen. Zunächst wurde der Ansatz mit 2.5 l PE/EtOAc 1:1 (V/V) bei RT über 2 Tage extrahiert. Anschließend folgten zwei weitere Extraktionen mit je 2 l des genannten Lösemittelgemisches. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer (40 °C; WB) schonend eingengt; die Ausbeute betrug 24 g. Der noch ölige Rückstand wurde auf Kieselgel aufgezogen und über eine offene Glassäule (KG = 300 g; ID = 6 cm; FH = 100 cm; FR = 9 ml/min) chromatographisch getrennt; das Auffangvolumen betrug 45 ml. Als Fließmittel dienten Cyclohexan, Cyclohexan/EtOAc-Gemische und MeOH:

1. 600 ml Cyclohexan
2. 1200 ml Cyclohexan/EtOAc 9:1 (V/V)
3. 1800 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
4. 1800 ml Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V/V)
5. 1500 ml Cyclohexan/EtOAc 3:7 (V/V)
6. 1500 ml Methanol.

Nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchung (Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V] bzw. Cyclohexan/EtOAc 3:7 [V/V], Detektion: Besprühen mit Anisaldehyd-Reagenz) wurden 15 Fraktionen gewonnen, von denen Fraktion 7-15 im *in-vitro*-Test untersucht wurden. Fraktion 11 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 8:2 [V/V], 1.1 g) und 12 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V], 3.2 g) erwiesen sich als aktiv mit IC₅₀-Werten < 12.5 µg/ml, während die anderen Fraktionen IC₅₀-Werte > 50 µg/ml aufwiesen. Die beiden aktiven Fraktionen wurden erneut über eine Kieselgelsäule (KG = 15 g; ID = 2.2 cm; l = 60 cm; FR = ca. 2.5 ml/min) aufgetrennt. Die Fließmittelgradienten setzten sich wie folgt zusammen:

Fraktion 11

1. 300 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
2. 400 ml Cyclohexan/EtOAc 7.5:2.5 (V/V)
3. 200 ml Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V/V)
4. 200 ml Methanol

Fraktion 12

1. 300 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
2. 300 ml Cyclohexan/EtOAc 7.5:2.5 (V/V)
3. 200 ml Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V/V)
4. 200 ml Cyclohexan/EtOAc 6:4 (V/V)
5. 300 ml Cyclohexan/EtOAc 5:5 (V/V)
6. 200 ml Cyclohexan/EtOAc 4:6 (V/V)
7. 200 ml Methanol.

Nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchung (Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V] bzw. Cyclohexan/EtOAc 3:7 [V/V], Detektion: Besprühen mit Anisaldehyd-Reagenz) erhielt man aus Fraktion 11 fünf Fraktionen (11.1-11.5) und aus Fraktion 12 sechs Fraktionen (12.1-12.6), die ebenfalls gegen *P. falciparum* getestet wurden. Da die aktiven Fraktionen komplexe Stoffgemische darstellten, wurde individuell die am effektivsten erscheinende Trennmethode ausgewählt. So wurden präp. HPLC, MPLC über RP-18-Material, Säulenchromatographie (SC) im Sinne einer Größenausschlußchromatographie über Sephadex®-Material oder gegebenenfalls zwei nacheinander durchgeführte Chromatographien eingesetzt, um die Inhaltsstoffe isolieren zu können. Zum besseren Verständnis sind die Trennmethode für Fraktion 11 und 12 schematisch in Abb. 5.1 und 5.2 dargestellt.

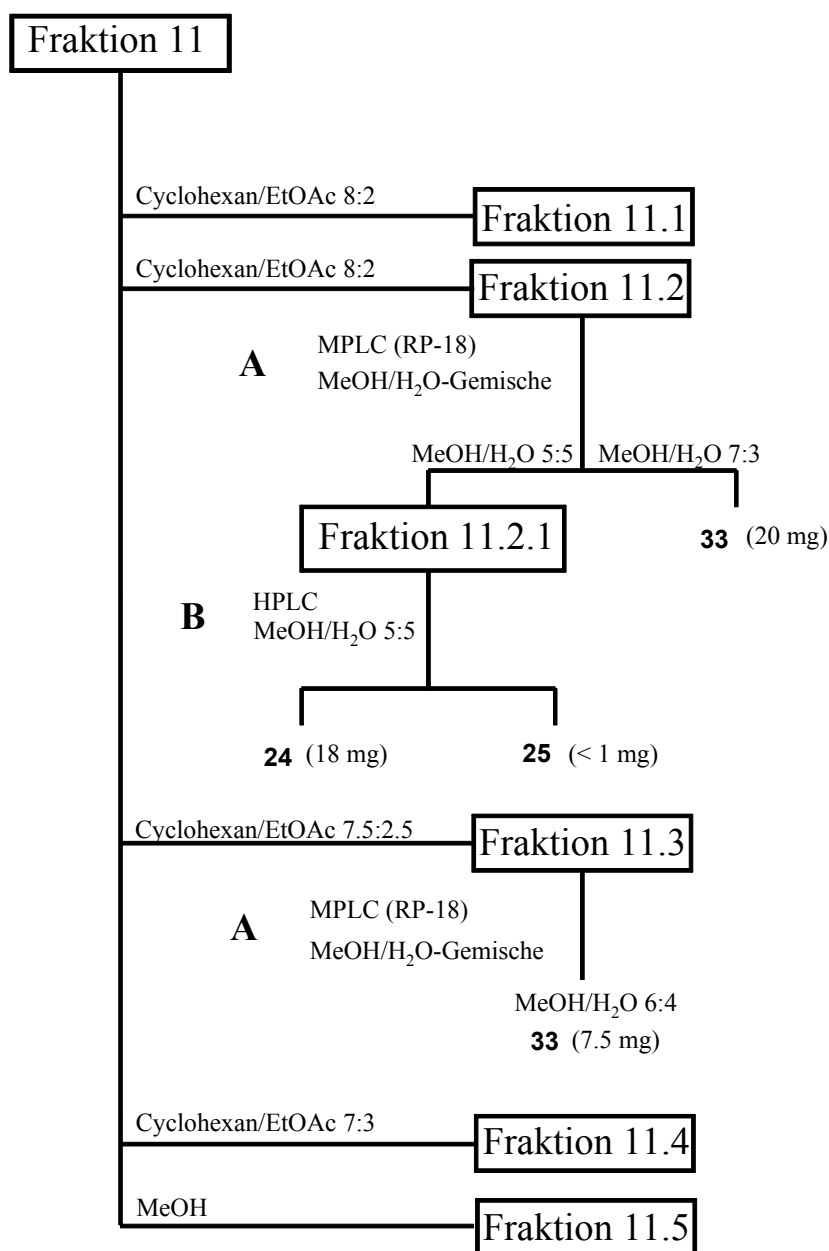


Abbildung 5.1: Fraktionierungsschema der Fraktion 11 von *A. afra*, erhalten nach einer Trennung auf Kieselgel mit Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V:V).

Zusätzlich werden im Folgenden die einzelnen Methoden (in den Abbildungen mit A-G bezeichnet) näher charakterisiert:

- A:** RP-18-Säule mit einem MeOH/Wasser-Gradienten (ID = 3 cm; FH = 7-10 cm; l = 32 cm; FR = 5-6 ml/min)
1. Fraktion 500 ml MeOH/Wasser 50:50 (V/V)
 2. Fraktion 500 ml MeOH/Wasser 55:45 (V/V)
 3. Fraktion 500 ml MeOH/Wasser 60:40 (V/V)
 4. Fraktion 500 ml MeOH/Wasser 70:30 (V/V)
 5. Fraktion 600 ml MeOH/Wasser 80:20 (V/V)
 6. Fraktion 800 ml MeOH/Wasser 90:10 (V/V)
 7. Fraktion 500 ml MeOH
- B:** präp. HPLC (MeOH/Wasser 50:50 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A)
- C:** präp. HPLC (MeOH/Wasser 55:45, nach 60 min 20:80, nach 90 min 100:0 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A)
- D:** offene Sephadex[®]-Säule (ID = 1.5 cm; FH = 40 cm; l = 60 cm; FR = 0.25 ml/min)
1. 50 ml MeOH/Wasser 30:70 (V/V)
 2. 50 ml MeOH/Wasser 40:60 (V/V)
 3. 50 ml MeOH/Wasser 45:55 (V/V)
 4. 25 ml MeOH/Wasser 50:50 (V/V)
 5. 100 ml MeOH/Wasser 60:40 (V/V)
 6. 100 ml MeOH/Wasser 70:30 (V/V)
 7. 50 ml MeOH/Wasser 80:20 (V/V)

dünnschichtchromatographische Untersuchung (Cyclohexan/EtOAc 3:7 [V/V], Detektion: Besprühen mit Anisaldehyd-Reagenz); anschließend folgte eine präp. HPLC (MeOH/Wasser 40:60, nach 45 min 70:30, nach 60 min 100:0 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) mit Fraktion 12.3.3 (eluiert mit MeOH/Wasser 40:60 [V/V] und MeOH/Wasser 45:55 [V/V]).

- E:** RP-18-Säule mit einem MeOH/Wasser-Gradienten (ID = 3 cm; FH = 7-10 cm; l = 32 cm; FR = 5-6 ml/min)
1. 400 ml MeOH/Wasser 50:50 (V/V)
 2. 250 ml MeOH/Wasser 50:50 (V/V)
 3. 500 ml MeOH/Wasser 70:30 (V/V)
 4. 400 ml MeOH
- jedes aufgetragene Volumen entsprach einer Fraktion;

anschließend folgte mit Fraktion 12.4.1 eine Trennung über eine offene Sephadex[®]-Säule (ID = 1.5 cm; FH = 45 cm; l = 60 cm; FR = 0.25 ml/min)

1. 50 ml MeOH/Wasser 40:60 (V/V)
2. 50 ml MeOH/Wasser 45:55 (V/V)
3. 50 ml MeOH/Wasser 50:50 (V/V)
4. 50 ml MeOH/Wasser 55:45 (V/V)
5. 275 ml MeOH/Wasser 60:40 (V/V)
6. 200 ml MeOH

dünnschichtchromatographische Untersuchung (EtOAc/MeOH 1:1 [V/V];
Detektion: UV-Löschung bei 254 nm).

F: RP-18-Säule mit einem MeOH/Wasser-Gradienten (ID = 3 cm; FH = 7-10 cm;
l = 32 cm; FR = 5-6 ml/min)

1. 500 ml MeOH/Wasser 30:70 (V/V)
2. 500 ml MeOH/Wasser 40:60 (V/V)
3. 500 ml MeOH/Wasser 50:50 (V/V)
4. 500 ml MeOH/Wasser 70:30 (V/V)
5. 400 ml MeOH

jedes aufgetragene Volumen entsprach einer Fraktion; anschließend folgte eine präp. HPLC (MeOH/Wasser 30:70 [V/V], FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A) mit Fraktion 12.5.1

G: präp. HPLC (MeOH/Wasser 35:65 [V/V], FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A)

Die Fraktionen 11.2 und 11.3, sowie 12.1-12.6 wiesen im *in-vitro*-Test gegenüber PoW folgende halbmaximale Hemmkonzentrationen auf:

Fraktion 11.2:	7.2	µg/ml
Fraktion 11.3:	5.9	µg/ml
Fraktion 12.1:	>12.5	µg/ml
Fraktion 12.2:	8.9	µg/ml
Fraktion 12.3:	6.3	µg/ml
Fraktion 12.4:	9.2	µg/ml
Fraktion 12.5:	7.6	µg/ml
Fraktion 12.6:	7.1	µg/ml.

Besonders in Fraktion 12.4, in der mehrere Flavonoide im Gemisch vorlagen, war eine Isolierung der Einzelkomponenten trotz verschiedener Trennmethode nicht immer ausreichend möglich. Aus den ¹H-NMR-Spektren war ersichtlich, dass mehrere methoxylierte Verbindungen vorlagen. Diese konnten nicht weiter aufgereinigt werden.

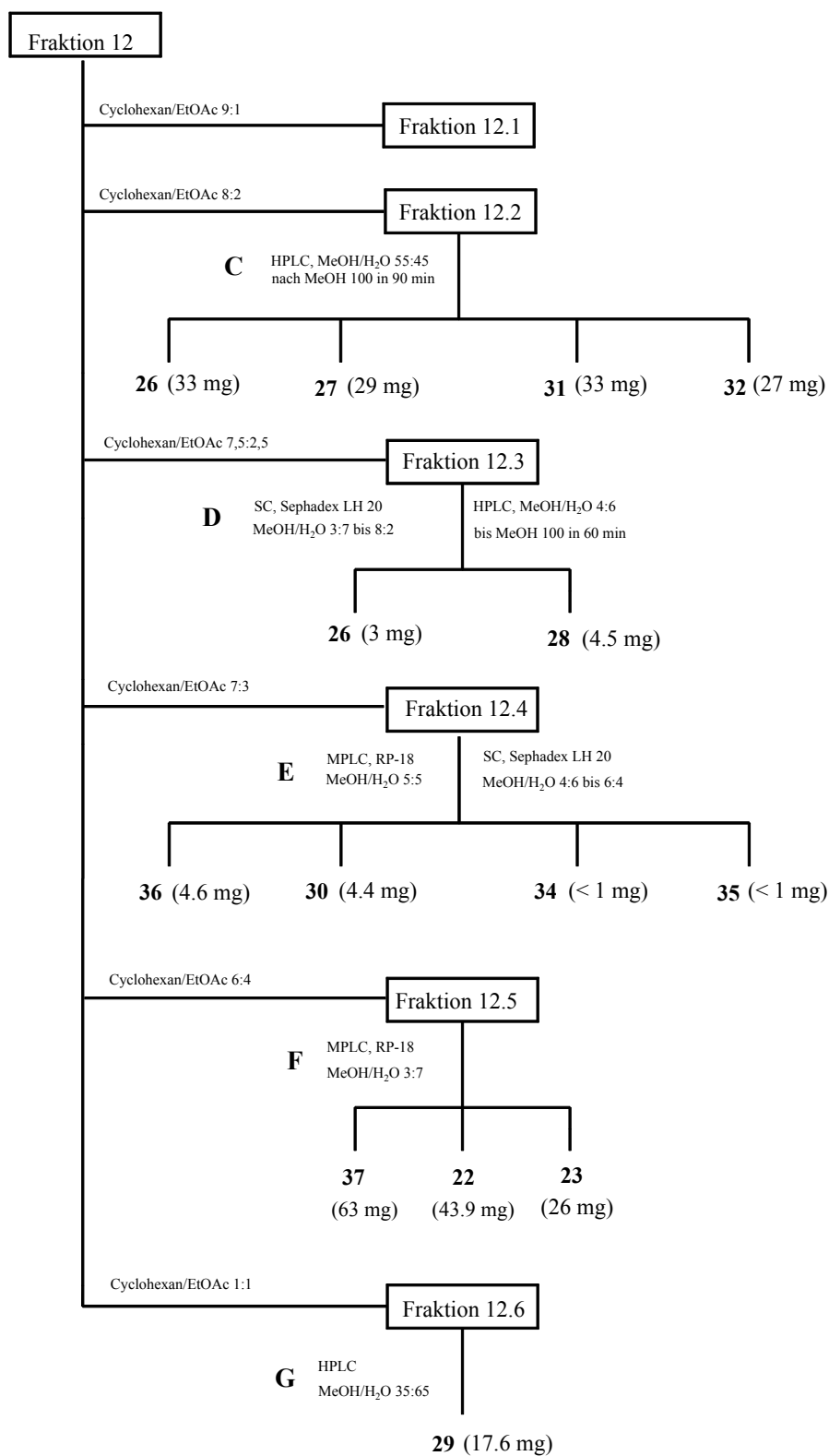
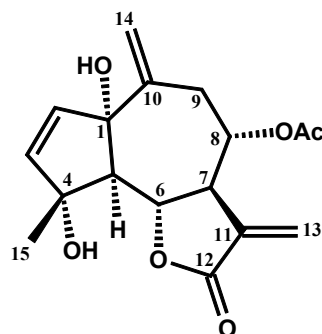


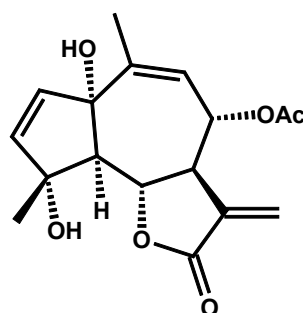
Abbildung 5.2: Fraktionierungsschema der Fraktion 12 von *A. afra*, erhalten nach einer Trennung auf Kieselgel mit Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V:V).

5.6.2 Strukturaufklärung der Sesquiterpenlaktone 22-29

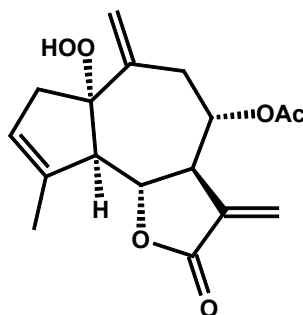
Eigenschaften von 1 α ,4 α -Dihydroxybishopsoliceolid (22)



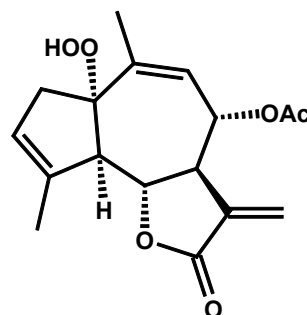
Menge:	43.9 mg
Eigenschaften:	weiß bis schwachgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (1:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.11
Detektion:	schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz nach graublau
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 308 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₇ H ₂₀ O ₆
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	220, 261
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	320 [M] ⁺ (1), 305 [M-CH ₃] ⁺ (9), 260 [M-HOAc] ⁺ (11), 242 [260-H ₂ O] ⁺ (10), 227 [242-CH ₃] ⁺ (5), 199 [260-CO] ⁺ (11), 98 (46), 43 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.35 (3H, s, CH ₃ -15), 2.15 (3H, s, COCH ₃), 2.46 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-5), 2.75 (1H, dd, J = 6.0 und 12.0 Hz, H-9b), 2.89 (1H, t, J = 12.0 Hz, H-9a), 3.65 (1H, dddd, J = 3.0, 8.6 und 12.0 Hz, H-7), 4.16 (1H, dd, J = 8.6 und 11.3 Hz, H-6), 4.89 (1H, brs, H-14a), 4.90 (1H, dt, J = 6.0 und 12.0 Hz, H-8), 5.13 (1H, brs, H-14b), 5.62 (1H, d, J = 5.7 Hz, H-2), 5.87 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-13a), 6.01 (1H, d, J = 5.7 Hz, H-3), 6.34 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-13b)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 8.6 μ g/ml [PoW]; 11.7 μ g/ml [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC ₅₀ -Wert: 5.3 μ g/ml

Eigenschaften von 1 α ,4 α ,8 α -Trihydroxyguaia-2,9,11(13)-trien-12,6 α -olid-8-*O*-acetat (23)

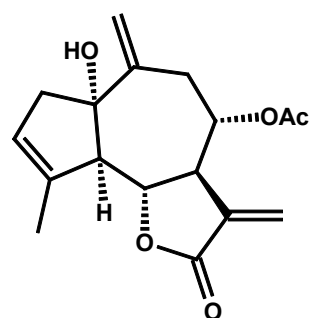
Menge:	26 mg
Eigenschaften:	weiß bis schwachgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (1:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.11
Detektion:	schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz nach graublau
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 280 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₇ H ₂₀ O ₆
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	206, 280
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	320 [M] ⁺ (2), 302 [M-H ₂ O] ⁺ (1), 260 [M-HOAc] ⁺ (9), 242 [260-H ₂ O] ⁺ (8), 43 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.25 (3H, <i>s</i> , CH ₃ -15), 1.79 (3H, <i>s</i> , CH ₃ -14), 2.14 (3H, <i>s</i> , COCH ₃), 2.67 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10.0 Hz, H-5), 4.13 (1H, <i>m</i> , H-7), 4.18 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9.5 und 10.0 Hz, H-6), 5.26 (1H, <i>dt</i> , <i>J</i> = 7.0 und 9.0 Hz, H-8), 5.71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.0 Hz, H-9), 5.72 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3.0 Hz, H-13a), 5.83 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 5.7 Hz, H-2), 5.98 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 5.7 Hz, H-3), 6.31 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3.0 Hz, H-13b)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 30.9 μ g/ml [PoW]; 20.4 μ g/ml [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC ₅₀ -Wert: > 200 μ g/ml

Eigenschaften von 1-Desoxy-1 α -peroxy-rupicolin A-8-O-acetat (24)

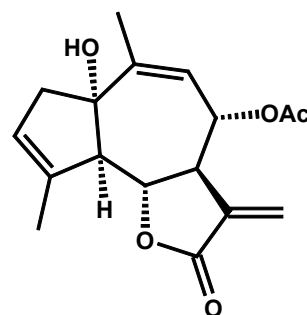
Menge:	18 mg
Eigenschaften:	farblos durchscheinender bis schwachgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (1:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.41
Detektion:	schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz nach altrosa
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 898 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₇ H ₂₀ O ₆
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	220
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	320 [M] ⁺ (1), 287 [M - OOH] ⁺ (10), 227 [287-HOAc] ⁺ (70), 106 (80), 91 (100), 57 (20), 43 (75)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.93 (3H, <i>s</i> , CH ₃ -15), 2.17 (3H, <i>s</i> , COCH ₃), 2.60 (2H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 10.0 Hz, H-9a,b), 2.78 (2H, <i>brs</i> , H-2a,b), 2.89 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 10.5 Hz, H-5), 3.30 (1H, <i>m</i> , H-7), 3.99 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9.0 und 10.6 Hz, H-6), 4.89 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 6.0, 8.0 und 10.0 Hz, H-8), 5.25 (1H, <i>brs</i> , H-14a), 5.33 (1H, <i>brs</i> , H-14b), 5.53 (1H, <i>brs</i> , H-3), 5.72 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3.0 Hz, H-13a), 6.31 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3.0 Hz, H-13b), 8.18 (1H, <i>brs</i> , 1-OOH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 8.7 μ g/ml [PoW]; 17.5 μ g/ml [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC ₅₀ -Wert: 10.6 μ g/ml

Eigenschaften von 1-Desoxy-1 α -peroxy-rupicolin B-8-O-acetat (25)

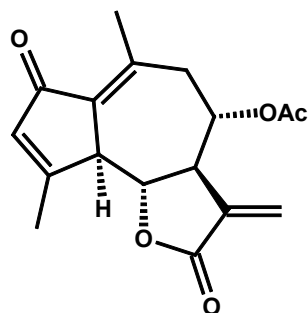
Menge:	< 1 mg
Eigenschaften:	farblos durchscheinender bis schwachgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (1:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.41
Detektion:	schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 920 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₇ H ₂₀ O ₆
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	220
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	320 [M] ⁺ (1), 287 [M - OOH] ⁺ (10), 43 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.91 (3H, <i>s</i> , CH ₃ -15), 2.16 (3H, <i>s</i> , COCH ₃), 1.86 (3H, <i>brs</i> , CH ₃ -14), 2.5 - 2.7 (1H, <i>m</i> , H-2), 3.28 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 10.5 Hz, H-5), 3.30 (1H, <i>m</i> , H-7), 3.99 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9.0 und 10.6 Hz, H-6), 5.36 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 10.5 Hz, H-8), 5.45 (1H, <i>brs</i> , H-3), 5.65 (1H, <i>brs</i> , H-9), 5.74 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3.0 Hz, H-13a), 6.27 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3.0 Hz, H-13b), 8.18 (1H, <i>brs</i> , 1-OOH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: n.b.

Eigenschaften von Rupicolin A-8-O-acetat (26)

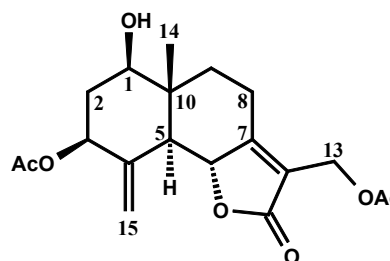
Menge:	36 mg
Eigenschaften:	gelblich durchscheinender Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (1:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.32
Detektion:	schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz von blau-grün nach lila
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 510 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₇ H ₂₀ O ₅
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	210
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	304 [M] ⁺ (2), 244 [M-HOAc] ⁺ (23), 201 (12), 165 (9), 148 (7), 120 (29), 91 (19), 43 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.93 (3H, <i>brs</i> , CH ₃ -15), 2.15 (3H, <i>s</i> , COCH ₃), 2.32 (1H, <i>brd</i> , J = 17.0 Hz, H-2b), 2.56 (1H, <i>dd</i> , J = 4.9, und 14.0 Hz H-9b), 2.68 (1H, <i>dd</i> , J = 6.5, und 14.0 Hz H-9a), 2.70 (1H, <i>brd</i> , J = 10.1 Hz, H-5), 2.88 (1H, <i>brd</i> , J = 17.0 Hz, H-2a), 3.29 (1H, <i>dddd</i> , J = 3.0, 3.5, 9.5 und 10.5 Hz H-7), 3.89 (1H, <i>dd</i> , J = 9.5 und 11.0 Hz, H-6), 4.92 (1H, <i>ddd</i> , J = 4.9, 6.4 und 11.0 Hz, H-8), 5.14 (1H, <i>brs</i> , H-14a), 5.39 (1H, <i>brs</i> , H-14b), 5.55 (1H, <i>brs</i> , H-3), 5.64 (1H, <i>d</i> , J = 3.0 Hz, H-13a), 6.23 (1H, <i>d</i> , J = 3.0 Hz, H-13b)
¹³ C-NMR (125 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	17.6 (C-15), 21.2 (COCH ₃), 36.3 (C-9), 45.9 (C-2), 48.0 (C-7), 64.9 (C-5), 74.3 (C-8), 79.2 (C-6), 84.5 (C-1), 117.5 (C-14), 122.5 (C-13), 124.7 (C-3), 136.9 (C-11), 140.5 (C-10) ^a , 144.0 (C-4) ^a , 169.3 (C-16) ^b , 170.1 (COCH ₃) ^b ^{a, b} Werte austauschbar
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 12.5 μg/ml [PoW]; 10.8 μg/ml [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC ₅₀ -Wert: 0.8 μg/ml

Eigenschaften von Rupicolin B-8-O-acetat (27)

Menge:	29 mg
Eigenschaften:	gelblich durchscheinender Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (1:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.32
Detektion:	schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz von blau-grün nach lila
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 590 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₇ H ₂₀ O ₅
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	210
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	304 [M] ⁺ (4), 244 [M-HOAc] ⁺ (24), 165 (36), 148 (56), 120 (100), 91 (29), 43 (6)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.93 (6H, <i>brs</i> , CH ₃ -14 und CH ₃ -15), 2.15 (3H, <i>s</i> , COCH ₃), 2.59 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 17.0 Hz, H-2b), 2.65 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 17.0 Hz, H-2a), 2.82 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 10.7 Hz, H-5), 3.5 (1H, <i>dddd</i> , <i>J</i> = 2.9, 3.3, 9.0 und 12.0 Hz H-7), 3.94 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9.0 und 10.7 Hz, H-6), 5.32 (1H, <i>m</i> , H-8), 5.46 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1.1 und 3.3 Hz, H-9), 5.49 (1H, <i>brs</i> , H-3), 5.69 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3.0 Hz, H-13a), 6.28 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3.0 Hz, H-13b)
¹³ C-NMR (125 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	17.6 (C-15), 21.0 (COCH ₃), 24.5 (C-14), 45.9 (C-7), 46.2 (C-2), 64.1 (C-5), 72.8 (C-8), 78.3 (C-6), 83.1 (C-1), 122.8 (C-9), 123.2 (C-13), 123.3 (C-3), 136.9 (C-11), 140.9 (C-10) ^a , 141.6 (C-4) ^a , 169.3 (C-16) ^b , 170.3 (COCH ₃) ^b ^{a, b} Werte austauschbar
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 20.1 μg/ml [PoW]; 31.8 μg/ml [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC ₅₀ -Wert: 2.5 μg/ml

Eigenschaften von 11,13-Dehydromatricarin (28)

Menge:	4.5 mg
Eigenschaften:	farbloser durchscheinender Feststoff
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm ; Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 40:60, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; $R_t = 381$ s; Gerät B
Summenformel:	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	210, 252
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	302 $[\text{M}]^+$ (3), 260 $[\text{M}-\text{COCH}_2]^+$ (4), 244 $[\text{M}-\text{HOAc}]^+$ (4), 43 (100)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm):	2.16 (3H, <i>s</i> , COCH_3), 2.34 (3H, <i>brs</i> , CH_3 -15), 2.45 (3H, <i>brs</i> , CH_3 -14), 2.47 (1H, <i>dd</i> , $J = 2$ und 13 Hz, H-9b), 2.72 (1H, <i>dd</i> , $J = 10$ und 13 Hz, H-9a), 3.26 (1H, <i>dddd</i> , $J =$ 3.0, 4.5 und 10.0 Hz, H-7), 3.52 (1H, <i>brd</i> , $J = 10.0$ Hz, H-5), 3.71 (1H, <i>t</i> , $J = 10.0$ Hz, H-6), 4.92 (1H, <i>dt</i> , $J =$ 2.1 und 10.0 Hz, H-8), 5.65 (1H, <i>d</i> , $J = 3.0$ Hz, H-13a), 6.20 (1H, <i>brs</i> , H-3), 6.23 (1H, <i>d</i> , $J = 3.0$ Hz, H-13b)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC_{50} -Wert: 17.9 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]; 12.5 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC_{50} -Wert: 25.7 $\mu\text{g/ml}$

Eigenschaften von Eudesmaafraglaucolid (29)

Menge: 17.5 mg

Eigenschaften: weiß bis schwachgelber Feststoff

HPLC-System: Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm ;
0.5% H_3PO_4 /MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30
min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R_t 385 s; Gerät A

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7$

UV (MeOH), λ_{max} (nm):

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 364 $[\text{M}]^+$ (4), 304 $[\text{M}-\text{HOAc}]^+$ (3), 244 $[\text{M}-2\text{xHOAc}]^+$
(33), 216 $[\text{244}-\text{CO}]^+$ (23), 43 (100)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3),
 δ (ppm):

0.94 (3H, *s*, CH_3 -14), 1.27 (1 H, *m*, H-9'), 1.66 (1 H,
m, H-2'), 1.77 (1H, *brd*, $J = 11.0$ Hz, H-5), 2.07 (3H, *s*,
13- COCH_3), 2.14 (3H, *s*, 3- COCH_3), 2.23 (1H, *dd*, $J =$
4.5 und 11.3 Hz, H-2), 2.30 (1H, *ddd*, $J = 1.5$, 4.2 und
13.4 Hz, H-9), 2.46 (1H, *ddd*, $J = 5.8$, 14.2 und 14.2 Hz,
H-8'), 3.07 (1H, *ddd*, $J = 1.5$, 3.0, und 14.2 Hz, H-8),
3.53 (1H, *dd*, $J = 4.5$ und 11.8 Hz, H-1), 4.78 (1H, *d*, $J =$
12.6 Hz, H-13a), 4.82 (1H, *d*, $J = 12.6$ Hz, H-13b),
5.02 (1H, *d*, $J = 11.0$ Hz, H-6), 5.13 (1H, *brd*, H-3), 5.13
(1H, *brs*, H-15a), 5.27 (1H, *brs*, H-15b)

Die Daten sind im Vergleich zu den Literaturdaten
(Jakupovic et al., 1988) um ca. 0.2 ppm ins Tieffeld
verschoben. Die Diskrepanz ist durch den Zusatz von
 CD_3OD zu erklären.

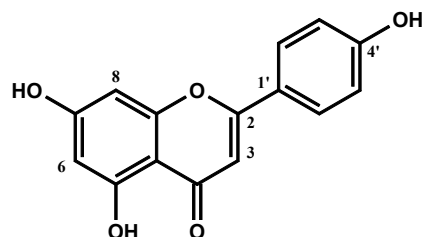
Antiplasmodiale Aktivität: IC_{50} -Wert: 47.5 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]; > 50 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]

Zytotoxizität (ECV-304): IC_{50} -Wert: 60.4 $\mu\text{g/ml}$

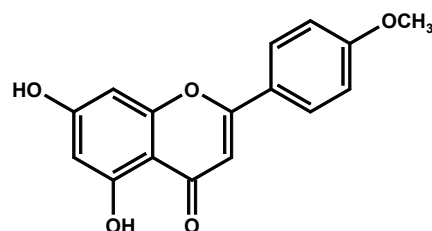
5.6.3 Strukturaufklärung der Flavonoide 30-36

Eigenschaften von Apigenin (30)

5, 7, 4'-Trihydroxyflavon



Menge:	4.4 mg
Eigenschaften:	hellgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /Aceton/Ameisensäure (9:1:0.1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.38
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: zitronengelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 20 min. 40:60, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 984 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	207, 264, 333
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	270 [M] ⁺ (100), 242 [M-CO] ⁺ (9), 152 (20), 118 (10)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	6.26 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.54 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.64 (1H, s, H-3), 7.03 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3'/5'), 7.95 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2'/6'), 13.02 (1H, s, 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 14.6 μg/ml [PoW]; 25.0 μg/ml [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC ₅₀ -Wert: 22.2 μg/ml

Eigenschaften von Acacetin (31)*5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon*

Menge: 33 mg

Eigenschaften: hellgelber Feststoff

Chromatographische Parameter: DC-System: KG 60 F₂₅₄; EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]; KS); R_f-Wert: 0.5; CHCl₃/Aceton/Ameisensäure (9:1:0.1 [V/V/V]; KS); R_f-Wert: 0.53

Detektion: gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: zitronengelb

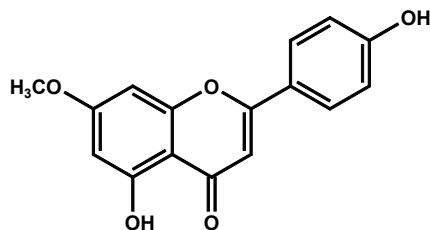
HPLC-System: Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H₃PO₄/ MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99); 1.5 ml/min; R_t 1126 s; Gerät A

Summenformel: C₁₆H₁₂O₅UV (MeOH), λ_{max} (nm): 219, 269, 335

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 284 [M]⁺ (100), 152 (8), 128 (12), 124 (6), 95 (18), 43 (49)

¹H-NMR (400 MHz, AcetonD₆), δ (ppm): 3.92 (3H, s, 4'-OCH₃), 6.26 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-6), 6.55 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-3), 7.13 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3'/5'), 8.02 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2'/6'), 12.98 (1H, s, 5-OH)

Antiplasmodiale Aktivität: IC₅₀-Wert: 5.5 μg/ml [PoW]; 12.6 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Genkwanin (32)*4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon*

Menge: 27 mg

Eigenschaften: hellgelber Feststoff

Chromatographische Parameter: DC-System: KG 60 F₂₅₄; EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]; KS); R_f-Wert: 0.5; CHCl₃/Aceton/Ameisensäure (9:1:0.1 [V/V/V]; KS); R_f-Wert: 0.6

Detektion: gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: zitronengelb

HPLC-System: Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H₃PO₄/MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R_t = 1149 s; Gerät A

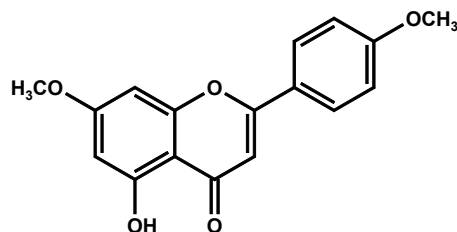
Summenformel: C₁₆H₁₂O₅UV (MeOH), λ_{max} (nm): 219, 266, 344

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 284 [M]⁺ (100), 167 (10), 138 (8), 115 (4), 95 (18), 43 (49)

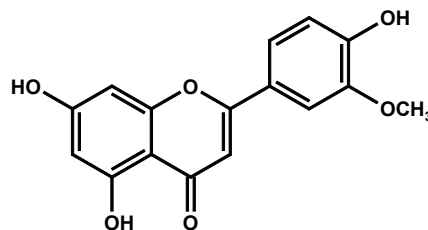
¹H-NMR (400 MHz, AcetonD₆), δ (ppm): 3.92 (3H, s, 4'-OCH₃), 6.32 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.69 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-3), 7.04 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3'/5'), 7.96 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2'/6'), 12.98 (1H, s, 5-OH)

Antiplasmodiale Aktivität: IC₅₀-Wert: 5.5 μg/ml [PoW]; 8.1 μg/ml [Dd2]

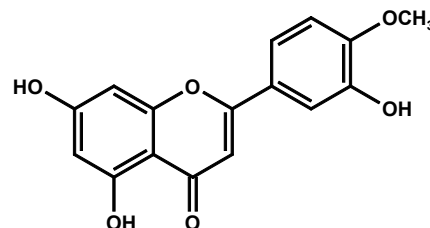
Zytotoxizität (ECV-304): IC₅₀-Wert: 30.2 μg/ml

Eigenschaften von 7-O-Methylacacetin (33)*4',7-Dimethoxy-5-hydroxyflavon*

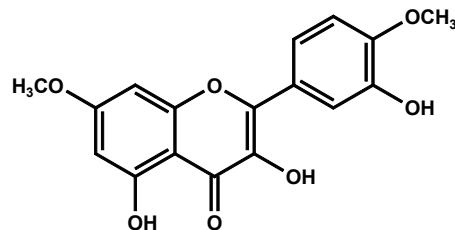
Menge:	20 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.56; CHCl ₃ /Aceton/Ameisensäure (9:1:0.1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.66
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: zitronengelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1340 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ O ₅
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	207, 268, 333
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	298 [M] ⁺ (100), 269 (20), 166 (11), 135 (20), 132 (18), 95 (15), 43 (45)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	3.88 und 3.89 (je 3H, s, 4'-OCH ₃ und 7-OCH ₃), 6.37 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.49 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.59 (1H, s, H-3), 7.02 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3'/5'), 7.85 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2'/6'), 12.85 (1H, s, 5-OH)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	3.93 und 3.94 (je 3H, s, 4'-OCH ₃ und 7-OCH ₃), 6.34 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.71 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.73 (1H, s, H-3), 7.14 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3'/5'), 8.06 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2'/6'), 12.96 (1H, s, 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 4.3 μg/ml [PoW]; 7.0 μg/ml [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC ₅₀ -Wert: 7.1 μg/ml

Eigenschaften von Chrysoeriol (34)*3'-Methoxy-4',5,7-trihydroxyflavon*

Menge:	<1 mg
Eigenschaften:	hellgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.41; CHCl ₃ /Aceton/Ameisensäure (9:1:0.1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.43
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: gelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 40:60, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1033 s; Gerät B
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	205, 263, 343
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	300 [M] ⁺ (100), 153 (14), 148 (7), 133 (9), 124 (5)
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	3.96 (3H, s, 4'-OCH ₃), 6.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.47 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.59 (1H, s, H-3), 6.94 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.49 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 7.51 (1H, dd, J = 1.9 und 8.2 Hz, H-6')
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: n.b.

Eigenschaften von Diosmetin (35)*4'-Methoxy-3',5,7-trihydroxyflavon*

Menge:	<1 mg
Eigenschaften:	hellgelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.35; CHCl ₃ /Aceton/Ameisensäure (9:1:0.1 [V/V/V]; KS); R _f -Wert: 0.43
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: gelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 40:60, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 996 s; Gerät B
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	205, 263, 343
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	300 [M] ⁺ (100), 153 (14), 148 (7), 133 (9), 124 (5)
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	3.94 (3H, s, 3'-OCH ₃), 6.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.45 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.59 (1H, s, H-3), 7.08 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-5'), 7.39 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 7.51 (1H, dd, J = 2.1 und 8.6 Hz, H-6')
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: n.b.

Eigenschaften von Tamarixetin (36)*3',5-Dihydroxy-4',7-dimethoxyflavonol*

Menge: 4.6 mg

Eigenschaften: hellgelber Feststoff

Chromatographische Parameter: DC-System: KG 60 F₂₅₄; EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]; KS); R_f-Wert: 0.42; CHCl₃/Aceton/Ameisensäure (9:1:0.1 [V/V/V]; KS); R_f-Wert: 0.45

Detektion: gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: gelb

HPLC-System: Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; Wasser/MeOH (50:50, nach 20 min. 40:60, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R_t = 830 s; Gerät B

Summenformel: C₁₇H₁₄O₇UV (MeOH), λ_{max} (nm): 214, 247 (Schulter), 250, 342

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 330 [M]⁺ (100), 315 [M - CH₃]⁺ (69), 166 (16), 164 (5), 149 (22), 139 (19), 132 (18), 69 (74), 43 (12)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃),
δ (ppm):

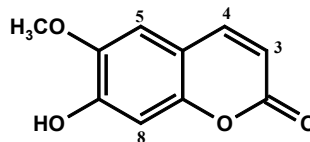
4.00 (3H, s, 4'-OCH₃), 4.05 (3H, s, 7-OCH₃), 6.06 (1H, brs, H-6), 6.56 (1H, brs, H-8), 7.04 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 7.33 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-2'), 7.04 (1H, dd, J = 1.5 und 8.4 Hz, H-6'), 13.07 (1H, s, 5-OH)

Antiplasmodiale Aktivität: IC₅₀-Wert: 33.9 μg/ml [PoW]; 33.0 μg/ml [Dd2]

5.6.4 Strukturaufklärung des Cumarins (37)

Eigenschaften von Scopoletin (37)

7-Hydroxy-6-methoxycumarin



Menge: 63 mg

Eigenschaften: hellgelbe Kristalle

Chromatographische Parameter: DC-System: KG 60 F₂₅₄; EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]; KS); R_f-Wert: 0.3

Detektion: gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm): hellblau

HPLC-System: Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H₃PO₄/MeOH (60:40, nach 20 min. 20:80, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R_t = 275 s; Gerät ASummenformel: C₁₀H₈O₄UV (MeOH), λ_{max} (nm): 227, 256, 295, 342EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 192 [M]⁺ (100), 177 [M-CH₃]⁺ (15), 164 [M-CO]⁺ (15), 149 [177-CO]⁺ (16)¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):3.95 (3H, s, 6-OCH₃), 6.84 (1H, s, H-5), 6.92 (1H, s, H-8), 7.27 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-3), 7.59 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-4)Antiplasmodiale Aktivität: IC₅₀-Wert: 24.0 μg/ml [PoW]; n. b. [Dd2]

5.7 Phytochemische Untersuchung von *Vernonia colorata*

5.7.1 Extraktion und Isolierung der Verbindungen 38-41

Zunächst wurden 150 g Blattdroge von *V. colorata* aufgearbeitet. Dazu wurde das getrocknete und zerkleinerte Pflanzenmaterial dreimal mit je 1 l PE/EtOAc (1:1 [V/V]) über drei Tage bei RT extrahiert. Nach Entfernen der Lösemittel am Rotationsverdampfer (40 °C; WB) erfolgte eine säulenchromatographische Trennung über Kieselgel mit 3.6 g Extrakt. Als Eluat dienten Cyclohexan, Cyclohexan/EtOAc-Gemische und MeOH. Von den acht gewonnenen Fraktionen erwies sich nur Fraktion 8 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V]) als aktiv (IC₅₀-Wert: 9.7 µg/ml [Dd2]). Eine erneute Auftrennung erfolgte mittels MPLC über eine RP-18-Säule (ID = 4 cm; l = 45 cm; FH = 45 cm), mit Wasser/MeOH-Gemischen steigender Lipophilie als Gradient. Eine antiplasmodiale Aktivität ließ sich in den ersten drei Fraktionen nachweisen (IC₅₀-Werte: 7.0 - 8.7 µg/ml [PoW]). Bei der weiteren Aufarbeitung traten jedoch Trennprobleme auf. Laut der HPLC-Chromatogramme stellten die drei Fraktionen komplexe Stoffgemische dar, eine isokratische Aufreinigung mittels präp. HPLC war daher nicht möglich. Auch die Versuche das Gemisch durch präp. DC oder eine erneute Kieselgelsäule zu trennen, schlugen fehl. Die so gewonnenen Banden bzw. Fraktionen stellten sich im ¹H-NMR-Spektrum erneut als Gemisch verwandter Substanzen heraus.

Daraufhin erfolgte eine zweite Extraktion, diesmal wurden 250 g Blattdroge aus derselben Ernte unter geänderten Bedingungen, angelehnt an die Arbeiten von Bohlmann et al. (1984) und Zdero et al. (1991), extrahiert. Dazu wurde das zerkleinerte Pflanzenmaterial viermal mit jeweils 1 l PE/Diethylether/MeOH (1:1:1 [V/V/V]) innerhalb von 2 Tagen bei RT behandelt. Nachdem dem Extrakt unter reduziertem Druck (40 °C; WB) die PE- und Diethyletherreste entzogen worden waren, wurde der verbliebene methanolische Extrakt über 2 Tage bei - 20 °C entfettet. Der in MeOH unlösliche Rückstand wurde über eine Nutsche unter Vakuum entfernt und der MeOH-Extrakt am Rotationsverdampfer (40 °C; WB) eingengt. 11 g dieses Rohextraktes wurden im ersten Schritt über eine offene Kieselgelsäule (KG = 150 g; ID = 3 cm; l = 70 cm, FH = 45 cm; FR = 5 - 10 ml/min) mit Cyclohexan, EtOAc und MeOH wie folgt getrennt:

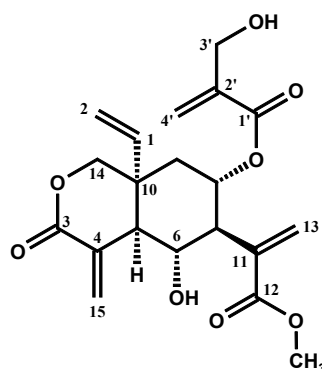
1. Fraktion: 300 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
2. Fraktion: 350 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
3. Fraktion: 200 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
4. Fraktion: 300 ml Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V/V)
5. Fraktion: 200 ml Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V/V)
6. Fraktion: 300 ml Cyclohexan/EtOAc 3:7 (V/V)
7. Fraktion: 200 ml Cyclohexan/EtOAc 3:7 (V/V)
8. Fraktion: 200 ml EtOAc
9. Fraktion: 500 ml Methanol,

dabei entsprach das jeweils angegebene Volumen einer Fraktion. Von den insgesamt 9 Fraktionen erwies sich wiederum nur Fraktion 8 (360 mg) als aktiv (IC₅₀-Wert: 4.7 µg/ml [PoW]). Als geeignetes Fließmittel für die präp. DC wurde eine Mischung aus Cyclohexan/EtOAc 3:7 (V/V) gewählt. Die Laufstrecke betrug 12 cm. Es wurden insgesamt

6 Banden nach Detektion eines Randstreifens mit Anisaldehyd/H₂SO₄-Reagenz ausgekratzt. Die Zonen 1, 2 und 3 wiesen eine ähnliche Zusammensetzung laut der HPLC-Chromatogramme sowie der ¹H-NMR-Spektren auf. Die erneute Auftrennung von Zone 2 (R_f-Bereich: 0.23-0.31; 70 mg) mittels präp. DC (Cyclohexan/EtOAc 1:9 [V/V]) ergab 33 mg von Substanz **38** (R_f-Wert: 0.3) und 20.5 mg von **39** (R_f-Wert: 0.38). Aus Zone 3 konnten ebenfalls die genannten Substanzen isoliert werden. Aus Zone 5 (R_f-Bereich: 0.36-0.4) konnten nach Reinigung über eine LiChrolut®-Festphasenextraktionssäule **40** und **41** als Gemisch (13.4 mg) gewonnen werden. Die Zonen 4 und 6 stellten Substanzgemische dar, die aufgrund der geringen Ausbeute nicht weiter aufgetrennt werden konnten.

5.7.2 Strukturaufklärung der Sesquiterpenlaktone 38-41

Eigenschaften von Vernodalol (**38**)



Menge:	33 mg
Eigenschaften:	schwachgelber durchscheinender Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (9:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.3
Detektion:	schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz nach hellgrau
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; Wasser/MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 656 s; Gerät B
Summenformel:	C ₂₀ H ₂₄ O ₈
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	222
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	392 [M] ⁺ (1), 290 (2), 230 (20), 148 (20), 130 (22), 85 [CO-C(CH ₂ OH)=CH ₂] ⁺ (100)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3),
 δ (ppm):

1.62 (1H, *dd*, $J = 11.0$ und 14.0 Hz, H-9a), 2.07 (1H, *dd*, $J = 4.8$ und 14.0 Hz, H-9b), 2.50 (1H, *dd*, $J = 1.7$ und 11.0 Hz, H-5), 2.74 (1H, *t*, $J = 11.0$ Hz, H-7), 3.77 (3H, *s*, COOCH_3), 4.11 (1H, *t*, $J = 11.0$ Hz, H-6), 4.26 (2H, *s*, H-3'), 4.36 (1H, *dd*, $J = 1.6$ und 11.8 Hz, H-14a), 4.68 (1H, *d*, $J = 11.8$ Hz, H-14b), 5.23 (1H, *d*, $J = 10.6$ Hz, H-2a), 5.24 (1H, *d*, $J = 17.5$ Hz, H-2b), 5.35 (1H, *dt*, $J = 4.8$ und 11.0 Hz, H-8), 5.69 (1H, *dd*, $J = 10.6$ und 17.5 Hz, H-1), 5.75 (1H, *brs*, H-13a)^a, 5.76 (1H, *brs*, H-15a)^a, 5.82 (1H, *brs*, H-4'a)^b, 6.17 (1H, *brs*, H-4'b)^b, 6.34 (1H, *brs*, H-13b)^c, 6.63 (1H, *brs*, H-15b)^c

^a, ^b, ^c Werte austauschbar

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3),
 δ (ppm):

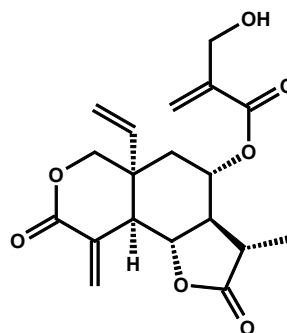
37.8 (C-9), 39.7 (C-10), 51.3 (C-5), 54.1 (C-7), 62.3 (C-3'), 68.9 (C-6), 69.3 (C-8), 70.9 (C-14), 116.1 (C-2), 126.3 (C-4'), 129.4 (C-13)^a, 132.3 (C-4), 133.8 (C-15)^a, 136.8 (C-11), 139.1 (C-2'), 140.6 (C-1), 163.8 (C-1'), 165.2 (C-3), 166.7 (C-12)

^a Wert austauschbar

Antiplasmodiale Aktivität: IC_{50} -Wert: 4.0 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]; 4.8 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]

Zytotoxizität (ECV-304): IC_{50} -Wert: 1.3 $\mu\text{g/ml}$

Eigenschaften von 11 β ,13-Dihydrovernodalin (39)



Menge: 20.5 mg

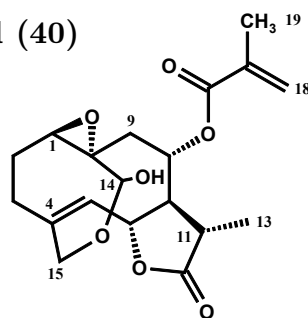
Eigenschaften: schwachgelber durchscheinender Feststoff

Chromatographische Parameter: DC-System: KG 60 F₂₅₄; EtOAc/Cyclohexan (9:1 [V/V]; KS); R_f -Wert: 0.38

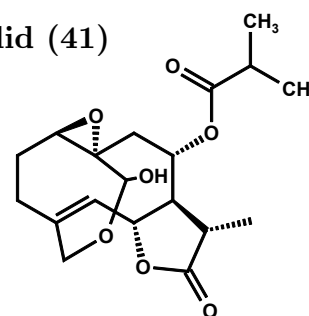
Detektion: schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz nach hellgrau

HPLC-System: Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm ;
 Wasser/MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; $R_t = 734$ s; Gerät B

Summenformel:	$C_{19}H_{22}O_7$
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	212
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	362 $[M]^+$ (1), 260 (5), 230 (32), 85 [CO-C(CH ₂ OH)=CH ₂] ⁺ (100)
(+)-FAB-MS, m/z :	363 $[M+H]^+$
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.42 (3H, <i>d</i> , $J = 6.9$ Hz, H-13), 1.71 (1H, <i>dd</i> , $J = 10.8$ und 14.2 Hz, H-9b), 2.04 (1H, <i>dt</i> , $J = 11.0$ und 12.1 Hz, H-7), 2.10 (1H, <i>dd</i> , $J = 4.6$ und 14.2 Hz, H-9a), 2.46 (1H, <i>dq</i> , $J = 6.9$ und 12.1 Hz, H-9a), 2.64 (1H, <i>m</i> , H- 11), 2.90 (1H, <i>dddd</i> , $J = 0.8, 1.0, 1.8$ und 11.0 Hz, H-5), 4.07 (1H, <i>t</i> , $J = 11.0$ Hz, H-6), 4.28 (1H, <i>dd</i> , $J = 1.8$ und 12.1 Hz, H-14a), 4.35 (2H, <i>s</i> , H-3'), 4.52 (1H, <i>d</i> , J $= 12.1$ Hz, H-14b), 5.12 (1H, <i>ddd</i> , $J = 4.68, 10.8$ und 11.0 Hz, H-8), 5.29 (1H, <i>dd</i> , $J = 2.0$ und 10.8 Hz, H-2a), 5.31 (1H, <i>dd</i> , $J = 2.0$ und 17.7 Hz, H-2b), 5.73 (1H, <i>dd</i> , $J = 10.8$ und 17.7 Hz, H-1), 5.94 (1H, <i>d</i> , $J = 1.0$ Hz, H-15a) ^a , 5.96 (1H, <i>dd</i> , $J = 0.8$ und 1.0 Hz, H-4'a) ^b , 6.27 (1H, <i>dd</i> , $J = 0.8$ und 1.0 Hz, H-4'b) ^b , 6.75 (1H, <i>d</i> , $J =$ 1.0 Hz, H-15b) ^a ^{a, b} Werte austauschbar
¹³ C-NMR (100.6 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	14.0 (C-13), 39.0 (C-9), 40.8 (C-10), 40.0 (C-5), 46.6 (C- 11), 54.4 (C-7), 62.1 (C-3'), 69.6 (C-8), 70.6 (C-14), 77.9 (C-6), 117.0 (C-2), 126.9 (C-4'), 129.8 (C-4), 135.8 (C- 15), 138.9 (C-2'), 139.7 (C-1), 163.1 (C-1'), 165.2 (C-3), 176.9 (C-12)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 2.3 μ g/ml [PoW]; 1.1 μ g/ml [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC ₅₀ -Wert: 1.4 μ g/ml

Eigenschaften von 11 β ,13-Dihydrovernodid (40)als Gemisch mit **41**

Menge:	13.4 mg
Eigenschaften:	schwachgelber durchscheinender Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.38
Detektion:	schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz nach grün-gelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; Wasser/MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 792 s; Gerät B
Summenformel:	C ₁₉ H ₂₄ O ₇
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	212
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	279 [M - C ₄ H ₅ O ₂] ⁺ (1), 278 (4), 260 (2), 232 [260 - CO] ⁺ (13), 203 [260 - CHO] ⁺ (13), 69 [CO - C(CH ₃)=CH ₂] ⁺ (52), 43 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.30 (1H, <i>dd</i> , J = 3.7 und 14.5 Hz, H-9a), 1.45 (3H, <i>d</i> , J = 6.9 Hz, C-13), 1.67 (1H, <i>m</i> , H-2a), 1.97 (3H, <i>s</i> , C-19), 2.16 (1H, <i>ddd</i> , J = 2.2, 9.0 und 17.5 Hz, H-7), 2.29 (1H, <i>m</i> , H-2b), 2.40 (2H, <i>m</i> , H-3), 2.58 (1H, <i>dd</i> , J = 10.7 und 14.5 Hz, H-9b), 2.67 (1H, <i>m</i> , H-11), 2.70 (1H, <i>dd</i> , J = 4.2 und 11.4 Hz, H-1), 3.67 (1H, <i>dd</i> , J = 1.2 und 13.8 Hz, H-15a), 4.53 (1H, <i>d</i> , J = 7.4 Hz, H-14), 4.58 (1H, <i>dd</i> , J = 1.5 und 13.8 Hz, H-15b), 5.15 (1H, <i>dd</i> , J = 2.8 und 10.0 Hz, H-6), 5.50 (1H, <i>brd</i> , J = 10.0 Hz, H-5), 5.52 (1H, <i>brd</i> , J = 10.4 Hz, H-8), 5.69 (1H, <i>brs</i> , H-18a), 6.16 (1H, <i>brs</i> , H-18b)
¹³ C-NMR (100.6 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	16.8 (13), 18.3 (C-19), 22.7 (C-2), 33.6 (C-3), 40.1 (C-11), 40.8 (C-9), 57.0 (C-7), 64.0 (C-15), 66.4 (C-1), 70.9 (C-8), 71.5 (C-10), 77.2 (C-6), 99.5 (C-14), 127.0 (C-18), 129.0 (C-5), 135.7 (C-17), 142.9 (C-5), 177.5 und 178.1 (C-12 und C-16)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: > 50 μ g/ml [PoW]; 37.3 μ g/ml [Dd2], getestet als Gemisch mit 41

Eigenschaften von 11 β ,13,17,18-Tetrahydrovernonolid (41)als Gemisch mit **40**

Menge:	13.4 mg
Eigenschaften:	schwachgelber durchscheinender Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (7:3 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.38
Detektion:	schwache Fluoreszenzminderung (254 nm); Verfärbung mit Anisaldehyd-Sprühreagenz nach grün-gelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; Wasser/MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 792 s; Gerät B
Summenformel:	C ₁₉ H ₂₆ O ₇
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	212
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	279 [M-C ₄ H ₇ O ₂] ⁺ (1), 278 (4), 260 (2), 232 [260-CO] ⁺ (13), 203 [260-CHO] ⁺ (13), 71 [CO-CH(CH ₃) ₂] ⁺ (75), 43 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.19 (6H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.9 Hz, C-18 und C-19), 1.30 (3H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3.7 und 14.5 Hz, H-9a), 1.45 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.9 Hz, C-13), 1.67 (1H, <i>m</i> , H-2a), 2.16 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 2.2, 8.5 und 17.5 Hz, H-7), 2.29 (1H, <i>m</i> , H-2b), 2.40 (1H, <i>m</i> , H-3), 2.58 (3H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 10.7 und 14.5 Hz, H-9b), 2.67 (1H, <i>m</i> , H-11), 2.69 (1H, <i>m</i> , H-17), 2.70 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4.2 und 11.4 Hz, H-1), 3.67 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1.2 und 13.8 Hz, H-15a), 4.53 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.4 Hz, H-14), 4.58 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1.5 und 13.8 Hz, H-15b), 5.15 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2.8 und 9.7 Hz, H-6), 5.50 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 11.7 Hz, H-5), 5.52 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 10.4 Hz, H-8)
¹³ C-NMR (100.6 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	16.8 (13), 18.7 und 18.9 (C-18 und C-19), 22.7 (C-2), 33.6 (C-3), 34.1 (C-17), 40.1 (C-11), 40.8 (C-9), 57.0 (C-7), 64.0 (C-15), 66.4 (C-1), 70.9 (C-8), 71.5 (C-10), 77.2 (C-6), 99.5 (C-14), 127.0 (C-18), 129.0 (C-5), 135.7 (C-17), 142.9 (C-5), 177.5 und 178.1 (C-12 und C-16)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: > 50 μ g/ml [PoW]; 37.3 μ g/ml [Dd2], getestet als Gemisch mit 40

5.8 Phytochemische Untersuchung von *Stereospermum kunthianum*

5.8.1 Extraktion und Isolierung der Verbindungen 42-44

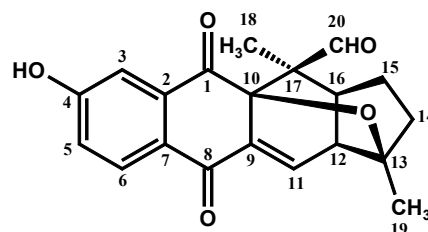
Die getrocknete und zerkleinerte Wurzelrinde (ca. 500 g) wurde dreimal mit je 1.5 l PE/EtOAc 1:1 (V/V) bei RT extrahiert. Nachdem das Lösemittelgemisch am Rotationsverdampfer (40 °C; WB) vollständig entfernt worden war, erhielt man 2 g eines öligen Rückstandes. Dieser Extrakt wurde auf einer offenen Kieselgelsäule (40 g) weiter aufgetrennt. Als Eluat dienten Gemische aus Cyclohexan und EtOAc (je 200 ml) mit steigender Hydrophilie. Als Spülung dienten 100 ml MeOH. Nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung der einzelnen Fraktionen wurden diese zu insgesamt neun Fraktionen (I-IX) einschließlich der MeOH-Spülfraktion vereinigt. Der *in vitro*-Test gegenüber Dd2 ergab folgendes Ergebnis (IC₅₀-Werte):

III:	> 100	μg/ml
IV:	9.8	μg/ml (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 70:30 [V/V])
V:	11.5	μg/ml (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 30:70 [V/V])
VI:	4.3	μg/ml (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 30:70 [V/V])
VII:	6.8	μg/ml

Die Ausbeute von Fraktion V war zu gering um eine weitere Aufreinigung vorzunehmen. Fraktion VII wurde im Rahmen der Kooperation nicht weiter bearbeitet. Fraktion IV wurde anschließend mit Hilfe der präp. HPLC (MeOH/H₂O 45:55 nach 20:80 in 80 min [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A) weiter aufgetrennt und lieferte Substanz **43**. Aus Fraktion VI konnten ebenfalls durch präp. HPLC (MeOH/H₂O 50:50 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A) die Substanzen **42** und **44** isoliert werden.

5.8.2 Strukturaufklärung der Naphthochinone 42-44

Eigenschaften von Pinnatal (42)



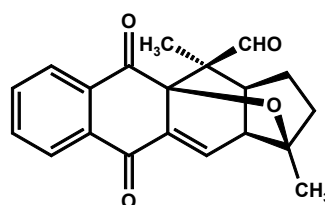
Menge: 100 mg

Eigenschaften: gelber Feststoff

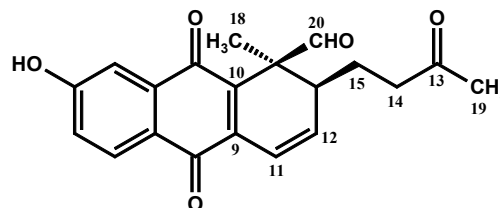
Summenformel: C₂₀H₁₈O₅

EI-MS, *m/z* (rel. Int. %), 80 eV: 338 [M]⁺ (5), 310 (11), 295 (23), 277 (46), 252 (93), 239 (100)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.13 (Seite 82)
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, AcetonD_6), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.13 (Seite 82)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC_{50} -Wert: 5.6 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]; 3.6 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC_{50} -Wert: 2.2 $\mu\text{g/ml}$

Eigenschaften von Sterekunthal B (43)

Menge:	29 mg
Eigenschaften:	gelbliches Öl
Summenformel:	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_4$
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 80 eV:	322 $[\text{M}]^+$ (10), 294 (15), 279 (16), 242 (38), 236 (32), 225 (100), 165 (18), 81 (35)
HR-MS, m/z , 80 eV:	322.1204 ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_4$, berechnet für 322.1205)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.13 (Seite 82)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC_{50} -Wert: 23.3 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]; 15.2 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC_{50} -Wert: 16.0 $\mu\text{g/ml}$

Eigenschaften von Sterekunthal A (44)

Menge: 43 mg

Eigenschaften: gelber Feststoff

Summenformel: $C_{20}H_{18}O_5$

$[\alpha]_D^{20}$: -10° ($CHCl_3$, c 0.44)

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 80 eV: 338 $[M]^+$ (4), 320 (13), 310 (11), 277 (80), 252 (93), 239 (100)

HR-MS, m/z , 80 eV: 338.1152 ($C_{20}H_{18}O_5$, berechnet für 338.1154)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$),
 δ (ppm): siehe Tabelle 2.14 (Seite 83)

^{13}C -NMR (125 MHz, $AcetonD_6$),
 δ (ppm): siehe Tabelle 2.14 (Seite 83)

Antiplasmodiale Aktivität: IC_{50} -Wert: 1.3 $\mu g/ml$ [PoW]; 0.4 $\mu g/ml$ [Dd2]

Zytotoxizität (ECV-304): IC_{50} -Wert: 0.9 $\mu g/ml$

5.9 Phytochemische Untersuchung von *Bonamia spectabilis*

5.9.1 Extraktion und Isolierung der Verbindungen 45-58

Es wurden die oberirdischen Teile sowie die Wurzeln von *B. spectabilis* untersucht. Das Kraut wurde im Juni 1998, die Wurzeln im April 2001 im institutseigenen Gewächshaus geerntet.

5.9.1.1 Extraktion der Krautdroge

360 g getrocknetes und gemahlene Kraut von *B. spectabilis* wurde dreimal mit jeweils 2 l MeOH unter Rühren bei RT extrahiert. Nach vollständigem Einengen der vereinigten Extrakte wurde der Rückstand in 900 ml 1 %iger wässriger Weinsäure-Lösung aufgenommen und dreimal mit je 900 ml PE und dreimal mit je 900 ml CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die jeweiligen Fraktionen wurden über Natriumsulfat getrocknet und die Lösemittel am Rotationsverdampfer (40 °C; WB) vollständig entfernt.

Der Rückstand aus der PE-Fraktion (7 g) wurde mit ca. 25 ml Acetonitril im Ultraschallbad partiell in Lösung gebracht und dann filtriert. DC-Versuche (Detektion mit Dragendorff's Reagenz) zeigten, dass im acetonitrilllöslichen Anteil Lignane bzw. ihre Derivate deutlich nachweisbar waren, dagegen nicht im stark chlorophyllhaltigen Rückstand. Nach Entfernen des Acetonitrils am Rotationsverdampfer (40°C; WB) verblieben 1.9 g Rückstand, der anschließend chromatographisch über Kieselgel (KG = 150 g; ID = 3 cm; l = 70 cm; FR = 2 ml/min) weiter aufgearbeitet wurde. Der Gradient aus Cyclohexan/EtOAc und EtOAc setzte sich wie folgt zusammen:

1. 200 ml Cyclohexan/EtOAc 9:1 (V/V)
2. 100 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
3. 1400 ml Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V/V)
4. 30 ml Cyclohexan/EtOAc 5:5 (V/V)
5. 150 ml EtOAc

Nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchung (Diethylether/PE 3:1 [V/V]; Zweifachentwicklung; Detektion: UV-Löschung bei 254 nm und Besprühen mit Dragendorff's Reagenz) wurden die Eluate in acht Fraktionen vereinigt. Fraktion 2 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V]) wurde auf RP-18-Festphasenextraktionssäulen aufgetragen und mit MeOH/Wasser-Mischungen (5:5; 6:4; 7:3; 8:2 [V/V]; 2-4 ml pro Eluat) unter Vakuum eluiert. Das Eluat mit 80 %igem MeOH wurde vollständig eingengt und ergab Verbindung **45** (24 mg).

Fraktion 4 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V]) wurde nach demselben Prinzip aufgereinigt und enthielt als Hauptkomponente **55** (33 mg).

In Fraktion 5 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V]) konnten mehrere Dragendorff-positive Verbindungen detektiert werden. Eine grobe Auftrennung erfolgte über RP-18-Festphasenextraktionssäulen mit MeOH/Wasser-Mischungen (5:5; 6:4; 7:3; 8:2 [V/V]; 4 ml pro Eluat) unter Vakuum. Die Verbindungen **46** (20 mg) und **47** (15 mg) (eluiert mit MeOH/Wasser 7:3 [V/V]) konnten präparativ mittels HPLC auf einer analytischen Säule

(MeOH/Wasser 30:70, nach 30 min 70:30 [V/V]; FR = 1.5 ml/min; Eurospher; Gerät B) getrennt werden.

Nachdem eine Aufreinigung über RP-18-Festphasenextraktionssäulen bzw. mittels präp. HPLC in Vorversuchen nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis führte, wurde Fraktion 8 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 5:5 [V/V]) mit Hilfe der präp. DC (CHCl₃/EtOAc 9:1 [V/V]; Zweifachentwicklung; Detektion: Dragendorff's Reagenz) getrennt. Die drei Hauptbanden stellten sich jeweils als Isomerenpaare heraus, so dass die Verbindungen **53/54** (R_f-Wert: 0.3; 4 mg) und **55/56** (R_f-Wert: 0.45; 7 mg) als Gemisch isoliert wurden. Die dritte Bande (R_f-Wert: 0.5) lieferte **48/49**, die ebenfalls in Fraktion 6 (eluiert mit Cyclohexan/EtOAc 7:3 [V/V] und 5:5 [V/V]) zusammen mit **57** nachweisbar waren. Der Rückstand aus der CH₂Cl₂-Fraktion (10 g) wurde über eine offene Kieselgelsäule (KG = 150 g; ID = 3 cm; FH = 45 cm; FR = 1.6 ml/min) wie folgt aufgetrennt:

1. 200 ml CHCl₃
2. 450 ml CHCl₃/MeOH 9:1 (V/V)
3. 400 ml CHCl₃/MeOH 8:2 (V/V)
4. 200 ml CHCl₃/MeOH 7:3 (V/V)
5. 200 ml MeOH

Nach dünn-schichtchromatographischer Untersuchung (CHCl₃/MeOH 8:2 [V/V]; Detektion: UV-Löschung bei 254 nm und Besprühen mit Dragendorff's Reagenz) wurden die Eluate zu acht Fraktionen vereinigt. Dragendorff-positive Banden konnten in Fraktion 6 (eluiert mit CHCl₃/MeOH 8:2 [V/V]) nachgewiesen werden. Die Aufreinigung der Glykoside **50** und **52** erfolgte isokratisch über präp. HPLC (MeOH/Wasser 75:25 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Eurospher; Gerät B). Eine nochmalige Endreinigung von Peak 1 (R_t = ca. 10 min) und Peak 2 (R_t = ca. 14 min) über eine RP-18-Festphasenextraktionssäule mit 70 %igem MeOH lieferte 91 mg von **50** und 145 mg von **52**.

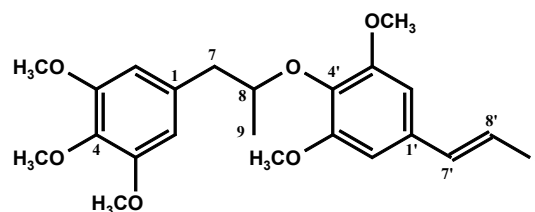
Um mögliche Vergleichsspektren zu erhalten, wurde mit **50** und **52** eine saure Hydrolyse durchgeführt. 10 mg Substanz wurden in 1 ml MeOH gelöst und mit 6 ml 3 %iger Salzsäure 40 min unter Rückfluß erhitzt. Danach wurde im Vakuum eingengt, um den MeOH zu entfernen. 5 ml Wasser wurden zugegeben und dreimal mit 10 ml EtOAc ausgeschüttelt, dann über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Kontrolle erfolgte über DC (CHCl₃/MeOH 8:2 [V/V] und Diethylether/PE 3:1 [V/V]; Zweifachentwicklung; Detektion: UV-Löschung bei 254 nm und Besprühen mit Dragendorff's Reagenz). Es konnte nur das Aglykon (**51**; R_f-Werte: 0.73 und 0.27, respektive) aus **50** (R_f-Werte: 0.56 und 0.15, respektive) unverändert gewonnen werden. Im zweiten Fall erhielt man Zersetzungsprodukte, die nicht weiter aufgeklärt werden konnten.

5.9.1.2 Extraktion der Wurzeldroge

50 g getrocknete und gemahlene Wurzeln wurden dreimal mit je 250 ml MeOH bei RT unter Rühren extrahiert. Nach Entfernung des Lösemittels im Vakuum wurde der Rückstand in 100 ml 2 %iger wässriger Weinsäure-Lösung aufgenommen und dreimal mit je 100 ml PE, CH₂Cl₂ und EtOAc ausgeschüttelt. Bei der dünn-schichtchromatographischen Untersuchung fielen Dragendorff-positive Banden in den PE und CH₂Cl₂-Fraktionen auf. Beide Fraktionen wurden über präp. HPLC (MeOH/Wasser 40:60, nach 40 min 70:30 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A) gereinigt und lieferten 200 mg eines 1:1 Gemisches aus **46** und **47** sowie 100 mg von **45**.

5.9.2 Strukturaufklärung der Lignane/Neolignane 45-47

Eigenschaften von Virolongin A (45)



Menge: 24 mg

Eigenschaften: blassgelbes Öl

Chromatographische Parameter: DC-System: KG 60 F₂₅₄; Zweifachentwicklung; Diethylether/PE (3:1 [V/V]; KS); R_f-Wert: 0.56

Detektion: Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: negativ

HPLC-System: Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm;
0.5% H₃PO₄/MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R_t = 1504 s; Gerät A

Summenformel: C₂₃H₃₀O₆

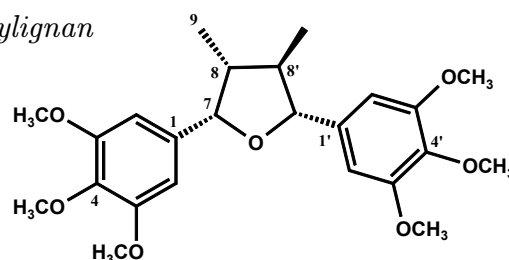
UV (MeOH), λ_{max} (nm): 209, 225 (Schulter), 267

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 402 [M]⁺ (20), 209 (100), 208 (17), 194 (33), 193 (6)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃),
δ (ppm):

1.22 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-9), 1.88 (3H, *dd*, *J* = 1.5 und 6.5 Hz, H-9'), 2.73 (1H, *dd*, *J* = 7.8 und 14 Hz, H-7a), 3.11 (1H, *dd*, *J* = 5.3 und 14 Hz, H-7b), 3.81-3.84 (15H, OCH₃-Gruppen), 4.39 (1H, *m*, H-8), 6.15 (1H, *dd*, *J* = 6.5 und 15.6 Hz, H-8'), 6.33 (1H, *dd*, *J* = 1.5 und 15.6 Hz, H-7'), 6.45 (2H, *s*, H-2/6), 6.55 (2H, *s*, H-2'/6')

Antiplasmodiale Aktivität: IC₅₀-Wert: 5.0 μg/ml [PoW]; 6.0 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Epigrandisin (46)*rel*-(7*S*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxylignan

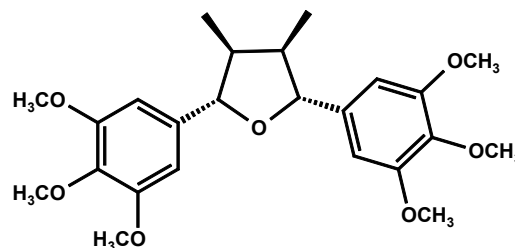
Menge: 20 mg

Eigenschaften: blassgelbes Öl

Chromatographische Parameter: DC-System: KG 60 F₂₅₄; Zweifachentwicklung; Diethylether/PE (3:1 [V/V]; KS); R_f-Wert: 0.36

Detektion: Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange

HPLC-System: Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H₃PO₄/MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R_t = 1340 s; Gerät ASummenformel: C₂₄H₃₂O₇UV (MeOH), λ_{max} (nm): 207, 235 (Schulter), 273EI-MS, *m/z* (rel. Int. %), 70 eV: 432 [M]⁺ (39), 236 (100), 221 (45), 205 (49), 195 (10)¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):0.70 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz, H-9), 1.12 (3H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-9'), 1.80 (1H, *m*, H-8'), 2.26 (1H, *m*, H-8), 3.83-3.88 (18H, OCH₃-Gruppen), 4.43 (1H, *d*, *J* = 9.1 Hz, H-7'), 5.11 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-7), 6.56 (2H, *s*, H-2/6), 6.74 (2H, *s*, H-2'/6')¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃), δ (ppm):14.9 (C-9')^a, 15.4 (C-9)^a, 46.1 (C-8), 47.8 (C-8'), 60.89 und 60.87 (4/4'-OCH₃), 56.15 und 56.07 (3/3'/5/5'-OCH₃), 83.3 (C-7'), 87.4 (C-7), 103.5 (C-2'/6'), 104.1 (C-2/6), 136.6 (C-1')^b, 136.7 (C-1)^b, 137.1 (C-4')^c, 137.6 (C-4)^c, 152.9 (C-3'/5')^d, 153.3 (C-3/5)^d
^a, ^b, ^c, ^dWerte austauschbarAntiplasmodiale Aktivität: IC₅₀-Wert: 46.0 μg/ml [PoW]; > 50 μg/ml [Dd2]

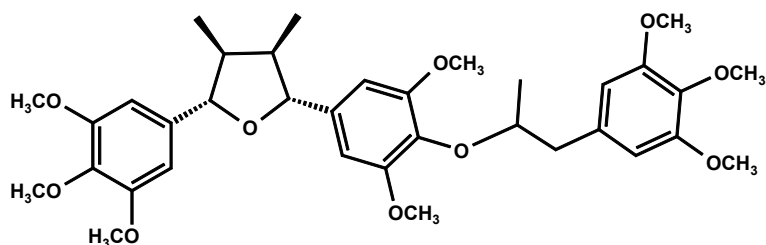
Eigenschaften von *rel*-(7*S*,8*S*,7'*R*,8'*R*)-3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxylignan (47)

Menge:	15 mg
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; Zweifachentwicklung; Diethylether/PE (3:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.36
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1370 s; Gerät A
Summenformel:	C ₂₄ H ₃₂ O ₇
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	207, 235 (Schulter), 273
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	432 [M] ⁺ (39), 236 (100), 221 (45), 205 (49), 195 (10)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.08 (6H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz, H-9/9'), 2.35 (2H, <i>m</i> , H-8/8'), 3.83-3.85 (18H, OCH ₃ -Gruppen), 4.53 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.2 Hz, H-7/7'), 6.67 (4H, <i>s</i> , H-2/2'/6/6')
¹³ C-NMR (100.6 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	13.1 (C-9/9'), 44.3 (C-8/8'), 60.86 (4/4'-OCH ₃), 56.10 (3/3'/5/5'-OCH ₃), 87.4 (C-7/7'), 103.5 (C-2'/6'), 103.4 (C-2/2'/6/6), 137.9 (C-1/1'), 136.7 (C-1), 137.5 (C-4/4'), 153.3 (C-3/3'/5/5')
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 50.0 μg/ml [PoW]; 36.8 μg/ml [Dd2]

5.9.3 Strukturaufklärung der Sesquilignane 48-56

Eigenschaften von Bonaspectin A (48)

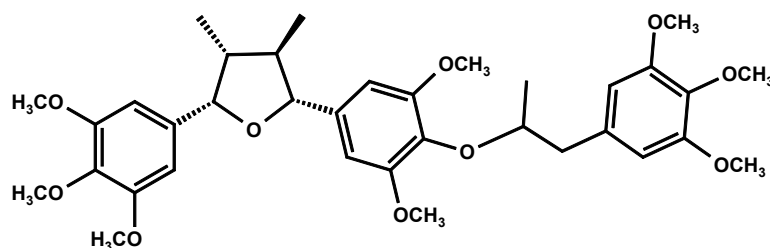
als Gemisch mit 49



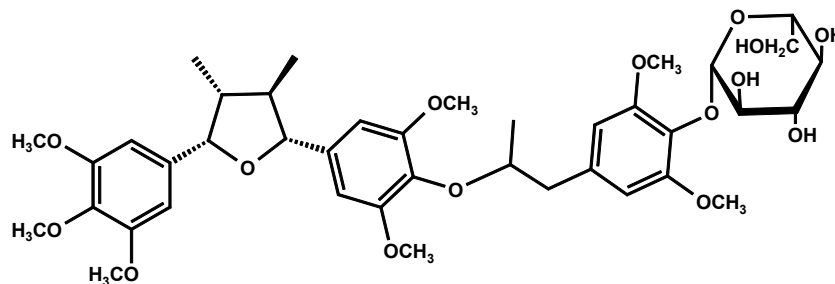
Menge:	10 mg
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; Zweifachentwicklung; CHCl ₃ /EtOAc (9:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.5
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (30:70, nach 20 min. 5:95 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 996 s; Gerät A
Summenformel:	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₀
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	210, 235 (Schulter), 270
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	626 [M] ⁺ (8), 418 (7), 236 (7), 209 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	1.07 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.4 Hz, H-9), 1.08 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.4 Hz, H-9'), 1.23 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.4 Hz, H-9''), 2.36 (2H, <i>m</i> , H-8/8'), 2.75 (1H, <i>m</i> , H-7''a), 3.12 (1H, <i>m</i> , H-7''b), 3.74-3.91 (21H, OCH ₃ -Gruppen), 4.39 (1H, <i>m</i> , H-8''), 4.52 (2H, <i>m</i> , H-7/7'), 6.47 (2H, <i>s</i> , H-2''/6''), 6.66 (2H, <i>s</i> , H-2'/6'), 6.67 (2H, <i>s</i> , H-2/6)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 8.1 μg/ml [PoW]; 8.2 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Bonaspectin B (49)

als Gemisch mit 48



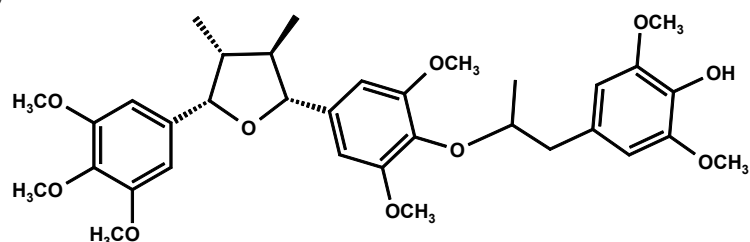
Menge:	10 mg
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; Zweifachentwicklung; CHCl ₃ /EtOAc (9:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.5
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (30:70, nach 20 min. 5:95 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 876 s; Gerät A
Summenformel:	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₀
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	210, 235 (Schulter), 270
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	626 [M] ⁺ (8), 418 (7), 236 (5), 209 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	0.7 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-9), 1.11 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-9'), 1.24 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-9''), 1.82 (1H, m, H-8'), 2.27 (1H, m, H-8), 2.75 (1H, m, H-7'a), 3.12 (1H, m, H-7'b), 3.74-3.91 (21H, OCH ₃ -Gruppen), 4.41 (1H, m, H-8''), 4.42 (1H, m, H-7'), 5.12 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-7) 6.48 (2H, s, H-2''/6''), 6.67 (2H, s, H-2/6), 6.74 (2H, s, H-2'/6')
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: n.b.

Eigenschaften von Bonaspectin C-4''- β -glukosid (50)

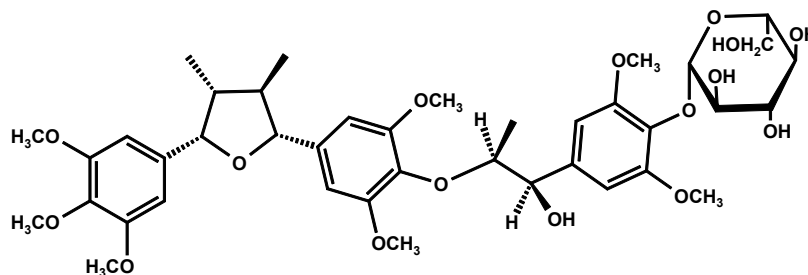
Menge:	91 mg
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /MeOH (8:2 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.56
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1243 s; Gerät A
Summenformel:	C ₄₀ H ₅₄ O ₁₅
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	210, 236 (Schulter), 272
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	612 [M-162] ⁺ (48), 445 (4), 418 (43), 236 (43), 222 (74), 195 (100), 194 (50)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	0.70 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.0 Hz, H-9), 1.12 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz, H-9'), 1.22 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.2 Hz, H-9''), 1.81 (1H, <i>m</i> , H- 8'), 2.26 (1H, <i>m</i> , H-8), 2.73 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.1 und 13.5 Hz, H-7''a), 3.11 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5.2 und 13.5 Hz, H-7''b), 3.38 (1H, <i>m</i> , H-5'''), 3.59 (1H, <i>m</i> , H-3'''), 3.64 (1H, <i>m</i> , H-4'''), 3.68 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8.5 Hz, H-2'''), 3.75-3.95 (2H, <i>m</i> , H-6''a/6''b), 3.83-3.86 (21H, OCH ₃ -Gruppen), 4.36 (1H, <i>m</i> , H-8''), 4.43 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9.2 Hz, H-7'), 4.53 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1'''), 5.11 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.6 Hz, H-7), 6.47 (2H, <i>s</i> , H-2''/6''), 6.56 (2H, <i>s</i> , H-2/6), 6.74 (2H, <i>s</i> , H-2'/6')
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 0.98 μ g/ml [PoW]; 1.3 μ g/ml [Dd2]
Zytotoxizität (ECV-304):	IC ₅₀ -Wert: 39.8 μ g/ml

Eigenschaften von Bonaspectin C (51)

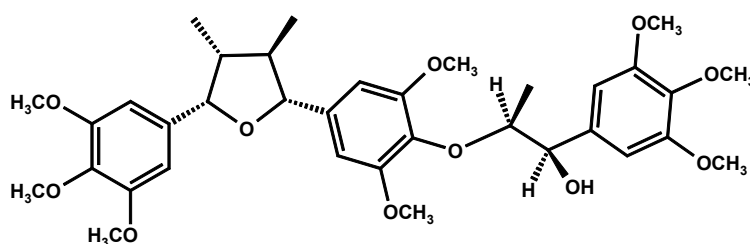
gewonnen durch saure Hydrolyse aus **50**



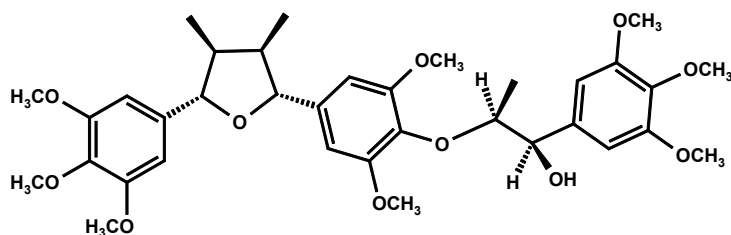
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /MeOH (8:2 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.73
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1359 s; Gerät A
Summenformel:	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₀
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	210, 234 (Schulter), 275
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	612 [M] ⁺ (15), 594 [M - H ₂ O] ⁺ (15), 418 (15), 400 (48), 246 (9), 236 (16), 222 (25), 195 (100), 167 (9)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	0.70 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.0 Hz, H-9), 1.12 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz, H-9'), 1.26 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.2 Hz, H-9''), 1.81 (1H, <i>m</i> , H-8'), 2.26 (1H, <i>m</i> , H-8), 2.79 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 7.0 und 13.6 Hz, H-7''a), 3.11 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5.2 und 13.6 Hz, H-7''b), 3.78- 3.86 (21H, OCH ₃ -Gruppen), 4.42 (1H, <i>m</i> , H-8''), 4.43 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9.0 Hz, H-7'), 5.11 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.6 Hz, H- 7), 6.54 (2H, <i>s</i> , H-2''/6''), 6.56 (2H, <i>s</i> , H-2/6), 6.74 (2H, <i>s</i> , H-2'/6')
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 1.2 μg/ml [PoW]; 2.8 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Bonaspectin D-4''- β -glukosid (52)

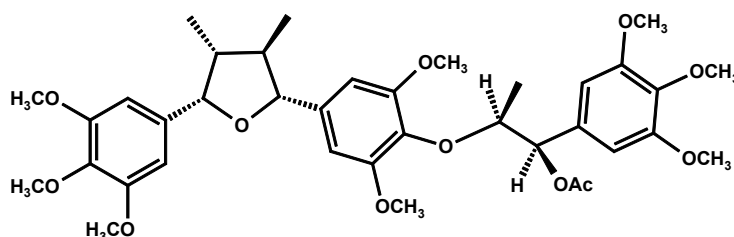
Menge:	145 mg
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; CHCl ₃ /MeOH (8:2 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.47
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μ m; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1126 s; Gerät A
Summenformel:	C ₄₀ H ₅₄ O ₁₆
UV (MeOH), λ_{max} (nm):	206, 240 (Schulter), 274
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	628 [M-162] ⁺ (4), 418 (80), 236 (59), 222 (93), 194 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	0.72 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.0 Hz, H-9), 1.15 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.4 Hz, H-9'), 1.22 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.2 Hz, H-9''), 1.84 (1H, <i>m</i> , H-8'), 2.29 (1H, <i>m</i> , H-8), 3.38 (1H, <i>m</i> , H-5'''), 3.59 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8.5 Hz, H-3'''), 3.67 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.5 Hz, H-4'''), 3.69 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8.5 Hz, H-2'''), 3.77-3.95 (2H, <i>m</i> , H-6'''a/6'''b), 3.80-3.90 (21H, OCH ₃ -Gruppen), 4.36 (1H, <i>m</i> , H-8''), 4.43 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9.2 Hz, H-7'), 4.55 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1'''), 4.79 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.5 Hz, H-7''), 5.13 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.6 Hz, H-7), 6.47 (2H, <i>s</i> , H-2''/6''), 6.59 (2H, <i>s</i> , H-2/6), 6.79 (2H, <i>s</i> , H-2'/6')
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 5.1 μ g/ml [PoW]; 2.9 μ g/ml [Dd2]

Eigenschaften von Bonaspectin E (53)als Gemisch mit **54**

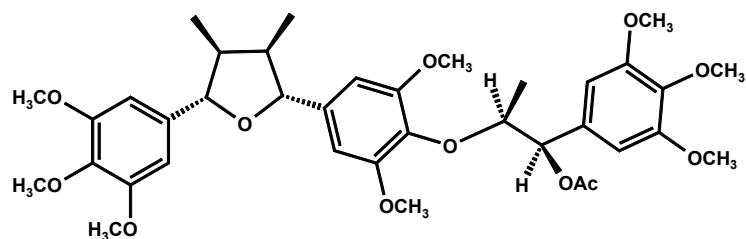
Menge:	4 mg
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; Zweifachentwicklung; CHCl ₃ /EtOAc (9:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.3
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1482 s; Gerät A
Summenformel:	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₁
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	211, 240 (Schulter), 270
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	642 [M] ⁺ (42), 418 (100), 267 (31), 236 (39), 222 (42), 195 (14)
HR-MS, m/z, 80 eV:	642.30646 (C ₃₅ H ₄₆ O ₁₁ , berechnet für 642.30401)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.17 (Seite 93)
¹³ C-NMR (100.6 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	12.8 (C-9''), 14.9 (C-9), 15.3 (C-9'), 46.1 (C-8), 56.1-56.2 (3/3'/3''/5/5'/5''-OCH ₃), 60.8 (4/4''-OCH ₃), 73.1 (C-7''), 82.2 (C-8''), 87.5 (C-7'), 103.0 (C-2''/6''), 103.4 (C-2'/C-6'), 104.2 (C-2/C-6), 135.5-137.5 (C-1/1'/1''/4/4'/4''), 153.0-153.7 (C-3/3'/3''/5/5'/5''). C-7 und C-8' konnten nicht bestimmt werden.
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 16.2 μg/ml [PoW]; 17.1 μg/ml [Dd2] als Gemisch mit 54

Eigenschaften von Bonaspectin F (54)als Gemisch mit **53**

Menge:	4 mg
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; Zweifachentwicklung; CHCl ₃ /EtOAc (9:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.3
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1500 s; Gerät A
Summenformel:	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₁
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	210, 240 (Schulter), 271
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	642 [M] ⁺ (42), 418 (100), 267 (31), 236 (39), 222 (42), 195 (14)
HR-MS, m/z, 80 eV:	642.30646 (C ₃₅ H ₄₆ O ₁₁ , berechnet für 642.30401)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.17 (Seite 93)
¹³ C-NMR (100.6 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	12.8 (C-9''), 13.1 (C-9, C-9'), 56.1-56.2 (3/3'/3''/5/5'/5''-OCH ₃), 60.8 (4/4''-OCH ₃), 73.3 (C-7''), 82.4 (C-8''), 87.5 (C-7/7'), 103.0 (C-2''/C-6''), 103.4 (C-2/C-6), 103.5 (C-2'/6'), 135.5-137.5 (C-1/1'/1''/4/4'/4''), 153.0-153.7 (C-3/3'/3''/5/5'/5''). C-8 und C-8' konnten nicht bestimmt werden.
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 16.2 μg/ml [PoW]; 17.1 μg/ml [Dd2] als Gemisch mit 53

Eigenschaften von Bonaspectin G (55)als Gemisch mit **56**

Menge:	7 mg
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; Zweifachentwicklung; CHCl ₃ /EtOAc (9:1 [V/V]); KS); R _f -Wert: 0.45
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1504 s; Gerät A
Summenformel:	C ₃₇ H ₄₈ O ₁₂
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	205, 240 (Schulter), 272
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	684 [M] ⁺ (8), 641 [M-Ac] ⁺ (2), 460 (8), 418 (19), 267 (100), 225 (31), 223 (38)
HR-MS, m/z, 80 eV:	684.31671 (C ₃₇ H ₄₈ O ₁₂ , berechnet für 684.31458)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	siehe 2.17 (Seite 93)
¹³ C-NMR (100.6 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	14.6 (C-9''), 14.9 (C-9), 15.3 (C-9'), 21.2 (COCH ₃), 46.1 (C-8), 47.9 (C-8'), 56.0-56.1 (3/3'/3''/5/5'/5''-OCH ₃), 60.7-61.1 (4/4''-OCH ₃), 76.7 (C-7''), 80.2 (C-8''), 83.3 (C-7), 87.5 (C-7'), 103.5 (C-2'/6'), 104.1 (C-2/6), 104.2 (C-2''/6''), 133.5-138.5 (C-1/1'/1''/4/4'/4''), 152.9-153.5 (C-3/3'/3''/5/5'/5''), 170.2 (COCH ₃)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 16.9 μg/ml [PoW]; 15.6 μg/ml [Dd2] als Gemisch mit 56

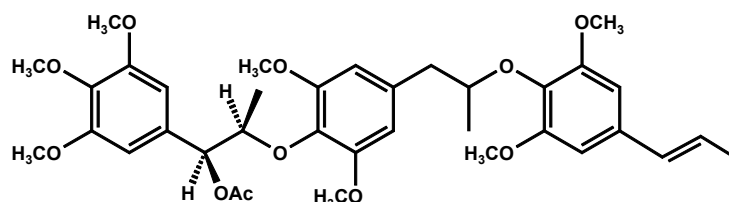
Eigenschaften von Bonaspectin H (56)als Gemisch mit **55**

Menge:	7 mg
Eigenschaften:	blassgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; Zweifachentwicklung; CHCl ₃ /EtOAc (9:1 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.45
Detektion:	Fluoreszenzminderung (254 nm); Färbung mit Dragendorff's Reagenz: orange
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (70:30, nach 20 min. 30:70, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 1518 s; Gerät A
Summenformel:	C ₃₇ H ₄₈ O ₁₂
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	206, 240 (Schulter), 272
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	684 [M] ⁺ (8), 641 [M-Ac] ⁺ (2), 460 (8), 418 (19), 267 (100), 225 (31), 223 (38)
HR-MS, m/z, 80 eV:	684.31671 (C ₃₇ H ₄₈ O ₁₂ , berechnet für 684.31458)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	siehe Tabelle 2.17 (Seite 93)
¹³ C-NMR (100.6 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	14.6 (C-9''), 13.1 (C-9), 13.2 (C-9'), 21.2 (COCH ₃), 44.0 (C-8, C-8'), 56.0-56.1 (3/3'/3''/5/5'/5''-OCH ₃), 60.7-61.1 (4/4''-OCH ₃), 76.7 (C-7''), 80.2 (C-8''), 87.5 (C-7/7'), 103.4 (C-2/6), 103.5 (C-2'/6'), 104.2 (C-2''/6''), 133.5-138.5 (C-1/1'/1''/4/4'/4''), 152.9-153.5 (C-3/3'/3''/5/5'/5''), 170.2 (COCH ₃)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 16.9 μg/ml [PoW]; 15.6 μg/ml [Dd2] als Gemisch mit 55

5.9.4 Strukturaufklärung der Sesquieneolignane 57-58

Eigenschaften von Neobonaspectin A (57)

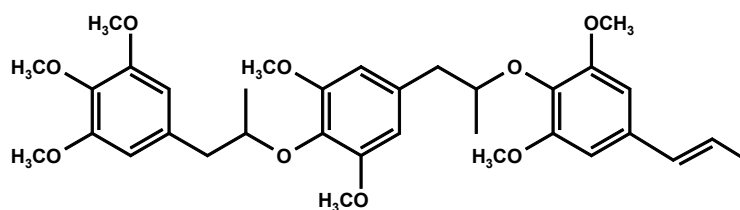
Strukturaufklärung siehe Tofern 1999 (Kapitel 2.3.1.3)



Antiplasmodiale Aktivität: IC_{50} -Wert: 6.5 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]; 7.1 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]

Eigenschaften von Neobonaspectin B (58)

Strukturaufklärung siehe Tofern 1999



Antiplasmodiale Aktivität: IC_{50} -Wert: 3.0 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]; 5.1 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]

5.10 Phytochemische Untersuchung von Birkenblättern

5.10.1 Extraktion und Isolierung von Verbindung 59

250 g getrocknete und gemahlene Birkenblätter wurden dreimal mit je 1.5 l PE/EtOAc 1:1 (V/V) bei RT extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösemittels folgte eine dreimalige Extraktion des getrockneten Pflanzenmaterials mit je 1.5 l MeOH/Wasser 8:2 (V/V). Nach Abziehen des MeOH-Anteils am Rotationsverdampfer (40 °C; WB) verblieben 400 ml wässriger Extrakt. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit je 400 ml CHCl₃ und 400 ml EtOAc ausgeschüttelt. Ein Teil der restlichen wässrigen Phase und die über Natriumsulfat getrockneten organischen Phasen wurden im Vakuum (40 °C; WB) zur Trockne einrotiert und auf ihre Aktivität (IC₅₀-Werte) gegen *P. falciparum* (Dd2) getestet:

CHCl ₃ -Phase:	17.1	μg/ml
EtOAc-Phase:	> 100	μg/ml
Wasser-Phase:	> 100	μg/ml.

Die CHCl₃-Fraktion (6 g) wurde über eine RP-18-Säule im Sinne einer MPLC (ID = 3 cm; FH = 7-10 cm; l = 32 cm; FR = 5-6 ml/min) chromatographiert. Als Fließmittel diente ein MeOH/Wasser-Gradient:

1. Fraktion: 300 ml MeOH/Wasser 5:5 (V/V)
2. Fraktion: 200 ml MeOH/Wasser 8:2 (V/V)
3. Fraktion: 200 ml MeOH/Wasser 9:1 (V/V)
4. Fraktion: 200 ml MeOH
5. Fraktion: 500 ml CHCl₃;

dabei entsprach jedes aufgetragene Volumen einer Fraktion. In Fraktion 3 konnte eine Aktivitätssteigerung gegen *P. falciparum* nachgewiesen werden (4.9 μg/ml [PoW]). Eine Aufreinigung erfolgte mittels präp. HPLC (MeOH/Wasser 45:55, nach 60 min 80:20 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A) und lieferte Verbindung **59** (5 mg).

Der lipophile PE-Extrakt (13.5 g) wurde über eine offene Kieselgelsäule (KG = 200 g; ID = 4 cm; FH = 60 cm) chromatographisch getrennt. Der Cyclohexan/EtOAc-Gradient setzte sich wie folgt zusammen:

1. Fraktion: 400 ml Cyclohexan
2. Fraktion: 400 ml Cyclohexan/EtOAc 9:1 (V/V)
3. Fraktion: 400 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
4. Fraktion: 400 ml Cyclohexan/EtOAc 8:2 (V/V)
5. Fraktion: 300 ml Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V/V)
6. Fraktion: 300 ml Cyclohexan/EtOAc 7:3 (V/V)
7. Fraktion: 500 ml Cyclohexan/EtOAc 3:7 (V/V)
8. Fraktion: 300 ml EtOAc
9. Fraktion: 700 ml Methanol

Insgesamt wurde der Extrakt in 9 Fraktionen je nach der Lösemittelzusammensetzung bzw. Farbgebung aufgeteilt. Die letzten drei Fraktionen wiesen gegenüber *P. falciparum* (Dd2) jeweils folgende Aktivitäten (IC₅₀-Werte) auf:

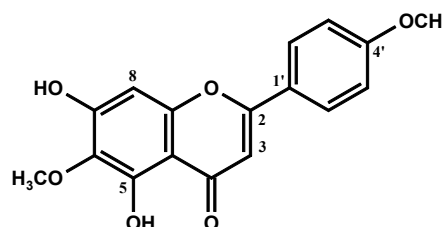
Fraktion 7:	3.4	μg/ml
Fraktion 8:	< 1.56	μg/ml
Fraktion 9:	< 1.56	μg/ml.

Die Hauptkomponente in Fraktion 7 konnte mittels analytischer HPLC erneut als Verbindung **59** identifiziert werden. Die beiden letzten Fraktionen enthielten überwiegend Chlorophyll-Derivate und wurden nicht weiter bearbeitet.

5.10.2 Strukturaufklärung des Flavons 59

Eigenschaften von Pectolarigenin (59)

5,7-Dihydroxy-4',6-dimethoxyflavon



Menge:	5 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (3:7 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.43
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: gelb
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 980 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	216, 273, 334
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	314 [M] ⁺ (100), 299 (58), 284 (22), 271 (39), 181 (6), 167 (21), 133 (31)
¹ H-NMR (400 MHz, AcetonD ₆), δ (ppm):	3.88 (3H, s, 6-OCH ₃), 3.92 (3H, s, 4'-OCH ₃), 6.64 (1H, s, H-3), 6.68 (1H, s, H-8), 7.13 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3'/5'), 8.03 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2'/6'), 13.22 (1H, s, 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 7.1 μg/ml [PoW]; 19.4 μg/ml [Dd2]

5.11 Phytochemische Untersuchung von Orthosiphonblättern

5.11.1 Extraktion und Isolierung der Verbindungen 60-62

Es wurden 250 g getrocknete und gemahlene Orthosiphonblätter dreimal mit je 1.2 l PE/EtOAc 1:1 (V/V) bei RT extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösemittels folgte eine dreimalige Extraktion des getrockneten Pflanzenmaterials mit je 1.2 l MeOH/Wasser 8:2 (V/V). Nach Abziehen des MeOH-Anteils am Rotationsverdampfer (40 °C; WB) verblieben 400 ml wässriger Extrakt. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit je 400 ml CHCl₃ und 400 ml EtOAc ausgeschüttelt. Ein Teil der restlichen wässrigen Phase und die über Natriumsulfat getrockneten organischen Phasen wurden im Vakuum (40 °C; WB) zur Trockne einrotiert und auf ihre Aktivität (IC₅₀-Werte) gegen *P. falciparum* (Dd2) getestet:

CHCl ₃ -Phase:	17.0	μg/ml
EtOAc-Phase:	52.9	μg/ml
Wasser-Phase:	> 100	μg/ml.

Die CHCl₃-Fraktion (4 g) wurde über eine RP-18-Säule im Sinne einer MPLC (ID = 3 cm; FH = 7-10 cm; l = 32 cm; FR = 5-6 ml/min) chromatographiert. Als Fließmittel diente ein MeOH/Wasser-Gradient:

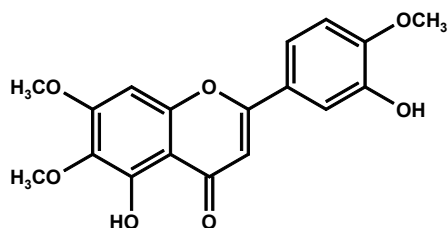
1. Fraktion: 200 ml MeOH/Wasser (5:5 [V/V])
2. Fraktion: 200 ml MeOH/Wasser (8:2 [V/V])
3. Fraktion: 200 ml MeOH
4. Fraktion: 400 ml CHCl₃;

dabei entsprach jedes aufgetragene Volumen einer Fraktion. In Fraktion 2 konnte eine Restaktivität von 30.2 μg/ml (Dd2) im *in-vitro*-Test bestimmt werden. Die anderen Fraktionen wiesen (IC₅₀-Werte) >> 50 μg/ml auf. Fraktion 2 wurde nun mit Hilfe der präp. HPLC (MeOH/Wasser 45:55, nach 80 min 80:20 [V/V]; FR = 5.5 ml/min; Nucleosil; Gerät A) grob in zwei Peaks aufgeteilt, die anschließend durch präp. DC gereinigt wurden. Peak 1 (R_t = 30 min) lieferte nach einmaliger Entwicklung mit Cyclohexan/EtOAc 3:7 (V/V) die Substanzen **62** (R_f-Wert: 0.29) und **61** (R_f-Wert: 0.33). Peak 2 (R_t = 40 min) ergab nach Reinigung mit dem gleichen Fließmittelgemisch die Verbindung **60** (R_f-Wert: 0.28).

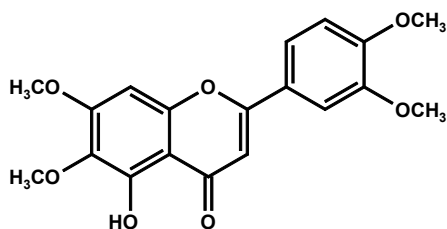
5.11.2 Strukturaufklärung der Flavone 60-62

Eigenschaften von Eupatorin (60)

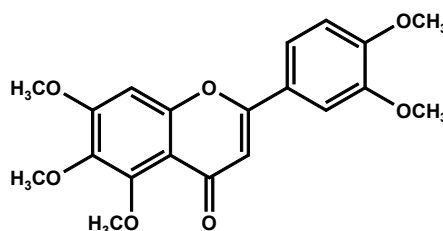
3',5-Dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavon



Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (3:7 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.28
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: neg.
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 748 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₆ O ₇
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	215, 272, 342
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	344 [M] ⁺ (100), 329 (84), 181 (19), 149 (21), 43 (67)
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	3.83 (3H, s, 6-OCH ₃), 3.95 (3H, s, 4'-OCH ₃), 3.98 (3H, s, 7-OCH ₃), 6.65 (1H, s, H-3), 6.81 (1H, s, H-8), 7.08 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-5'), 7.43 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2'), 7.53 (1H, dd, J = 2.4 und 8.6 Hz, H-6')
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 4.9 μg/ml [PoW]; 8.3 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von 3'-Methyleupatorin (61)*5-Hydroxy-3',4',6,7-tetramethoxyflavon*

Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (3:7 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.33
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: neg.
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 891 s; Gerät A
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₈ O ₇
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	215, 272, 342
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	358 [M] ⁺ (84), 343 (63), 329 (21), 43 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃), δ (ppm):	3.93, 3.97, 3.98, 3.99 (je 3H, s, 3',4',6,7-OCH ₃), 6.56 (1H, s, H-3), 6.61 (1H, s, H-8), 6.89 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 7.35 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 7.53 (1H, dd, J = 2.1 und 8.5 Hz, H-6'), 12.75 (1H, s, 5-OH)
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 2.3 μg/ml [PoW]; 2.2 μg/ml [Dd2]

Eigenschaften von Sinensetin (62)*3',4',5,6,7-Pentamethoxyflavon*

Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	DC-System: KG 60 F ₂₅₄ ; EtOAc/Cyclohexan (3:7 [V/V]; KS); R _f -Wert: 0.29
Detektion:	gelbe Färbung (Tageslicht); Fluoreszenzminderung (254 nm); Fluoreszenz (366 nm) nach Besprühen mit Naturstoffreagenz: neg.
HPLC-System:	Eurospher C-18, 4 x 250 mm, 7 μm; 0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (50:50, nach 30 min. 1:99 [V/V]); 1.5 ml/min; R _t = 755 s; Gerät A
Summenformel:	C ₂₀ H ₂₀ O ₇
UV (MeOH), λ _{max} (nm):	212, 241 (Schulter), 266, 333
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	372 [M] ⁺ (35), 357 (100), 343 (26), 341 (21), 328 (13), 311 (9), 167 (17), 150 (4)
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD), δ (ppm):	3.86, 3.91, 3.92, 3.94, 4.01 (je 3H, s, 3',4',5,6,7-OCH ₃), 6.64 (1H, s, H-3), 7.09 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 7.11 (1H, s, H-8), 7.49 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 7.61 (1H, dd, J = 1.8 und 8.5 Hz, H-6')
Antiplasmodiale Aktivität:	IC ₅₀ -Wert: 4.8 μg/ml [PoW]; 6.8 μg/ml [Dd2]

