

2 Hauptteil

2.1 Screening verschiedener Heilpflanzen aus El Salvador

Auf der Grundlage eingehender Literaturstudien und Datenbankrecherchen wurden folgende Heilpflanzen aus El Salvador auf ihre antiplasmodiale *in-vitro*-Wirkung untersucht:

Iresine calea (IBÁÑEZ) STANDL. (Amaranthaceae),

Calea tenuifolia KUNTH [syn.: *C. zacatechichi* SCHLECHT.] (Asteraceae),

Momordica charantia L. (Cucurbitaceae),

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae),

Samanea saman (JACQ.) MERR. [syn.: *Albizia saman* (JACQ.) F.V. MUELL.] (Fabaceae),

Hymenaea courbaril L. (Fabaceae),

Moringa oleifera LAM. (Moringaceae) und

Exostema mexicanum GRAY (Rubiaceae).

In Tabelle 1 werden die traditionellen Anwendungen der Heilpflanzen bzw. verwandter Arten, der verwendete Pflanzenteil und bisher isolierte Verbindungen wiedergegeben.

Tab. 1:

Phytotherapeutische Anwendungen und isolierte Inhaltsstoffe verschiedener Heilpflanzen aus El Salvador

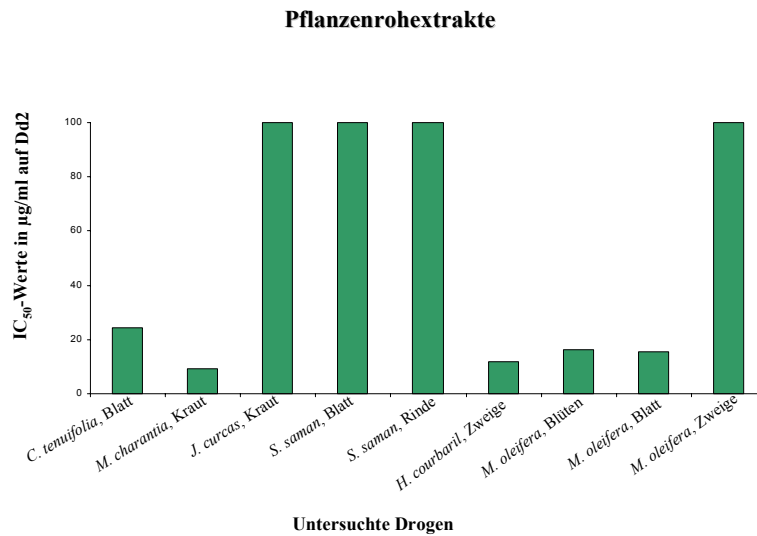
Pflanzenfamilie/ Pflanzenart	Verwendeter Pflanzenteil	Traditionelle Anwendung	Isolierte Verbindungen
Amaranthaceae <i>Iresine calea</i>	Blatt	Malaria (Morton, 1981)	Steroide, Terpenoide (Crabbe <i>et al.</i> , 1961)
Asteraceae <i>Calea tenuifolia</i>	Blatt	Fiebermittel (Martinez, 1959), Hämorrhagie, Malaria (Heinrich, 1989), Billharziose, Diarrhöe (Baytelman, 1979), Trauminduktion (Mayagoita <i>et al.</i> , 1986)	Sesquiterpenlaktone (Ortega <i>et al.</i> , 1970, Bohlmann <i>et al.</i> , 1977 und 1981a, Quijano <i>et al.</i> , 1977 und 1978, Herz <i>et al.</i> , 1980), Flavonoide (Herz <i>et al.</i> , 1980)

Tab. 1: Fortsetzung

Pflanzenfamilie/ Pflanzenart	Verwendeter Pflanzenteil	Traditionelle Anwendung	Isolierte Verbindungen
Cucurbitaceae <i>Momordica charantia</i>	Kraut	Malaria (Muñoz <i>et al.</i> , 2000b), Hypoglykämie (Matsuda <i>et al.</i> , 1998)	Triterpenglykoside vom Curcubitacin-Typ (Matsuda <i>et al.</i> , 1998)
Euphorbiaceae <i>Jatropha curcas</i>	Oberirdische Pflanzenteile	Fiebermittel (Morton, 1981), Billharziose (Liu <i>et al.</i> , 1997)	Phorbolster (Liu <i>et al.</i> , 1997)
Fabaceae <i>Samanea saman</i>	Blatt, Rinde	bei Malaria: Verwendung von <i>Albizia amara</i> BOIV. (Watt <i>et al.</i> , 1962),	Saponine (Varshney <i>et al.</i> , 1985)
Fabaceae <i>Hymenaea courbaril</i>	Zweige	Chinin-Ersatz, bei Rheuma (Morton, 1981)	Diterpene (Khoo <i>et al.</i> , 1973)
Moringaceae <i>Moringa oleifera</i>	Blüten	als Antibiotikum (Faizi <i>et al.</i> , 1995), Antitumormittel (Murakami <i>et al.</i> , 1998)	Isothiocyanate (Faizi <i>et al.</i> , 1995), Thiocarbamate (Murakami <i>et al.</i> , 1998)
Rubiaceae <i>Exostema mexicanum</i>	Rinde, Zweige	Malaria (Standley <i>et al.</i> , 1975), Chinin-Ersatz und Fiebermittel: Verwendung von <i>E. caribaeum</i> und <i>E. sanctae-luciae</i> (Beuze, 1973)	Cucurbitacine (Mata <i>et al.</i> , 1990), 4-Phenylcumarine (Sánchez-Viesca, 1969, Mata <i>et al.</i> , 1987 und 1988)

Für das entsprechende Screeningprogramm wurden von allen zur Verfügung stehenden Pflanzenteilen jeweils ein lipophiler Rohextrakt (PE-EtOAc 1:1) und ein methanolischer

Rohextrakt hergestellt (siehe Kap. 5.5.3.1.). Von *C. tenuifolia* und *E. mexicanum* wurden zusätzlich wässrige Extrakte hergestellt.



Oberird. PT: oberirdische Pflanzenteile

Abb. 24: Graphische Darstellung der *in-vitro*-Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum* der lipophilen Rohextrakte der Heilpflanzen aus El Salvador

Tab. 2:

IC₅₀-Werte der Rohextrakte der untersuchten Heilpflanzen aus El Salvador

Pflanzenart	Pflanzenteil	Extrakt	IC ₅₀ -Werte (µg/ml) ^a	
			PoW	Dd2
<i>Iresine calea</i>	Blätter	lipophil ^b	5,8	8,2
		methanolisch ^c	> 50	> 50
	Blüten	lipophil	> 50	> 50
		methanolisch	> 50	> 50
	Zweigrinde	lipophil	> 50	> 50
		methanolisch	> 50	> 50
<i>Calea tenuifolia</i>	Blätter	lipophil	24,3	10,4
		methanolisch	19,5	19,7
<i>Momordica charantia</i>	Kraut	lipophil	10,3	9,4
		methanolisch	> 50	> 50

Tab. 2: Fortsetzung

Pflanzenart	Pflanzenteil	Extrakt	IC ₅₀ -Werte (µg/ml) ^a	
			PoW	Dd2
<i>Jatropha curcas</i>	Oberirdische Pflanzenteile	lipophil	> 50	> 50
		methanolisch	> 50	> 50
<i>Samanea saman</i>	Blätter	lipophil	> 50	> 50
		methanolisch	46,4	10,0
	Rinde	lipophil	> 50	> 50
		methanolisch	35,5	7,3
<i>Hymenaea courbaril</i>	Zweige	lipophil	11,8	11,8
		methanolisch	> 50	> 50
<i>Moringa oleifera</i>	Blüten	lipophil	6,0	16,3
		methanolisch	> 50	> 50
	Blätter	lipophil	7,8	15,4
		methanolisch	> 50	> 50
	Zweige	lipophil	> 50	> 50
		methanolisch	> 50	> 50
<i>Exostema mexicanum</i>	Zweig- und Stammrinde	lipophil	9,0	11,5
		methanolisch	> 50	> 50
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄			0,008	0,073

^a: getestet als Triplikate

^b: PE-EtOAc (1:1)

^c: MeOH (100 %)

Von den acht getesteten Heilpflanzen konnte bei sieben Arten eine Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten festgestellt werden. Die lipophilen Rohextrakte von *I. calea*, *C. tenuifolia*, *E. mexicanum*, *H. coubaril*, *M. oleifera* und *M. charantia* zeigten eine antiplasmodiale Aktivität mit IC₅₀-Werten zwischen 5,8 µg/ml und 24,3 µg/ml (jeweils gegenüber PoW). Die methanolischen Rohextrakte von *C. tenuifolia* und *S. saman* zeigten ebenfalls eine antiparasitäre Wirkung mit IC₅₀-Werten zwischen 7,3 µg/ml [Dd2] und 35,5 µg/ml [PoW]. Aufgrund dieser Testergebnisse wurden die Heilpflanzen *Iresine calea*, *Calea tenuifolia* und *Exostema mexicanum* für aktivitätsgeleitete Fraktionierungen ausgewählt.

2.2 Screening verschiedener Heilpflanzen aus Ghana

Mehrfache Aufenthalte in Ghana (1997, 1998, 2000, 2001) führten zu einer engen Zusammenarbeit mit dem Phytotherapeuten T. B. F. Bruce in der Region Greater Accra des Landes. In zahlreichen Gesprächen konnten eine Vielzahl ethnobotanischer Informationen dokumentiert werden. Aus der Gesamtheit der Aussagen des Phytotherapeuten (Bruce 1998, 2000, 2001) und umfangreicher Literaturstudien sowie Datenbankrecherchen wurden folgende westafrikanische Pflanzenarten für eine *in-vitro*-Testung ausgewählt:

Gomphrena celosioides MART. (Amaranthaceae),

Picralima nitida (STAPF) TH. & H. DURAND (Apocynaceae),

Pergularia daemia (FORSSK) CHIOV. (Asclepiadaceae),

Emilia sonchifolia (L.) DC. (Asteraceae),

Microglossa pyrifolia (LAM.) KUNTZE [syn.: *Conyza pyrifolia* LAM.], (Asteraceae),

Adansonia digitata L. (Bombacaceae),

Euphorbia hirta L. (Euphorbiaceae),

Phyllanthus niruroides MÜLL. ARG. (Euphorbiaceae),

Tetrapleura tetraptera (SCHUHM. & THONN.) TAUB. (Mimosaceae),

Mitragyna inermis (WILLD.) KUNTZE (Rubiaceae) und

Mitragyna stipulosa (DC.) KUNTZE (Rubiaceae).

In Tabelle 3 werden die traditionellen Anwendungen der Pflanzenarten, der verwendete Pflanzenteil und bisher isolierten Verbindungen angegeben.

Tab. 3:

Phytotherapeutische Anwendungen und bisher isolierte Inhaltsstoffe verschiedener Heilpflanzen aus Ghana

Pflanzenfamilie/ Pflanzenart	Verwendeter Pflanzenteil	Phytotherapeutische Anwendung	Isolierte Inhaltsstoffe
Amaranthaceae <i>Gomphrena celosioides</i>	Kraut	Malaria (Bruce 1998 und 2000)	Steroide (Banerji <i>et al.</i> , 1971)

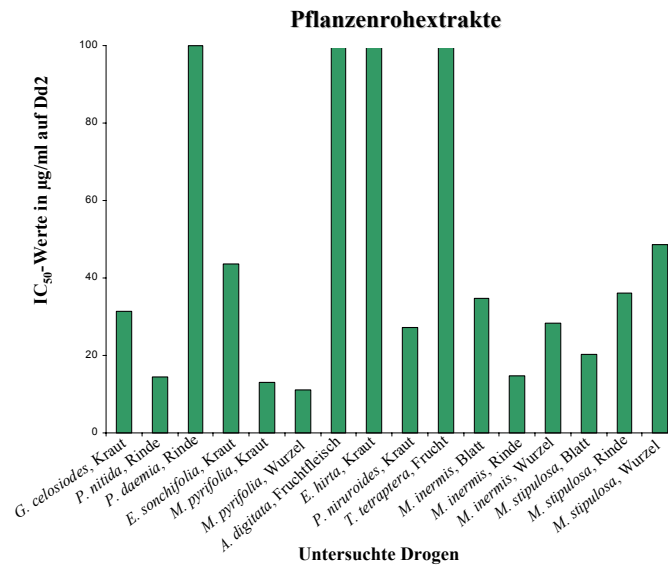
Tab. 3: Fortsetzung

Pflanzenfamilie/ Pflanzenart	Verwendeter Pflanzenteil	Phytotherapeutische Anwendung	Isolierte Inhaltsstoffe
Apocynaceae <i>Picralima nitida</i>	Rinde	Ersatz für Chinin (Neuwinger 1994), Malaria (Bruce 2001, François <i>et al.</i> , 1996)	Indolalkaloide (Kapadia <i>et al.</i> , 1993, Menzies <i>et al.</i> , 1998)
Asclepiadaceae <i>Pergularia daemia</i>	Zweigrinde	bei Erkältung (Dokosi 1998), bei Fieber (Bruce 2001, Jain <i>et al.</i> , 1998)	Cardenolide (Seshadri <i>et al.</i> , 1971), Triterpene (Talapatra <i>et al.</i> , 1981)
Asteraceae <i>Emilia sonchifolia</i>	Oberirdische Pflanzenteile	Fiebermittel (Abbiw 1990), Malaria (Azuine 1998)	Flavonoide, Sterole (Srinivasan <i>et al.</i> , 1980), Pyrrolizidinalkaloide (Cheng <i>et al.</i> , 1986)
Asteraceae <i>Microglossa pyrifolia</i>	Oberirdische Pflanzenteile, Wurzel	Fiebermittel (Abbiw 1990), Malaria (Bruce 1998, 2000, 2001)	Acetylene, Furano- diterpene, Geranyl- geraniol-Derivate (Rücker <i>et al.</i> , 1992 und 1994, Zdero <i>et al.</i> , 1990), Dihydrobenzo- furane, Triterpene (Hildebrandt <i>et al.</i> , 2000)
Bombacaceae <i>Adansonia digitata</i>	Fruchtfleisch	Fiebermittel (Abbiw 1990), Malaria (Azuine 1998), Sichelzellanämie (Adesanya, 1987)	Fettsäuren (Ramesh <i>et al.</i> , 1992)

Tab. 3: Fortsetzung

Pflanzenfamilie/ Pflanzenart	Verwendeter Pflanzenteil	Phytotherapeutische Anwendung	Isolierte Inhaltsstoffe
Euphorbiaceae <i>Euphorbia hirta</i>	Kraut	Malaria (Dokosi 1998, Tona <i>et al.</i> 1999)	Triterpene (Baslas <i>et al.</i> 1980), Flavonoide (Rao <i>et al.</i> 1983), Dimere Tannine (Yoshida <i>et al.</i> 1990)
Euphorbiaceae <i>Phyllanthus niruroides</i>	Oberirdische Pflanzenteile	Malaria (Bruce 1998, 2000)	Alkaloid (Babady–Bila <i>et al.</i> , 1996)
Mimosaceae <i>Tetrapleura tetraptera</i>	Frucht	Malaria (Neuwinger 1994), Bilharziose (Adewunmi <i>et al.</i> , 1989)	Triterpen–Saponine (Adesina <i>et al.</i> 1985), Saponine (El Izzi <i>et al.</i> 1990)
Rubiaceae <i>Mitragyna inermis</i>	Blatt, Rinde, Wurzel	Analgetikum (Abbiw 1990), Malaria (Bruce 1998, 2000, 2001, Mustofa <i>et al.</i> 2000), Insektizid (Belmain <i>et al.</i> , 2001)	Alkaloide (Traore <i>et al.</i> , 2000)
Rubiaceae <i>Mitragyna stipulosa</i>	Blatt, Rinde, Wurzel	Malaria (Bruce 1998, 2000, 2001), Antidot bei Schlangenbiss (Abbiw 1990)	Alkaloide (Houghton <i>et al.</i> , 1976)

Für das entsprechende Screeningprogramm wurden von allen zur Verfügung stehenden Pflanzenteilen jeweils ein lipohiler Rohextrakt (PE–EtOAc 1:1), ein methanolischer Rohextrakt und ein wässriger Auszug hergestellt (Kap. 5.5.3.1. und 5.5.3.3.).



Oberird. PT: oberirdische Pflanzenteile

Abb. 25: Graphische Darstellung der *in-vitro*-Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum* der lipophilen Rohextrakte aller untersuchten Pflanzenarten aus Ghana

Tab. 4:

IC₅₀-Werte [Dd2] der Rohextrakte der untersuchten Pflanzenarten aus Ghana

Pflanzenart	Pflanzenteil	Extrakt	IC ₅₀ -Werte (µg/ml) ^a	
			PoW	Dd2
<i>Gomphrena celosioides</i>	Kraut	lipophil ^b	36,9	31,5
		methanolisch ^c	> 50	> 50
<i>Picralima nitida</i>	Rinde	lipophil	> 50	14,5
		methanolisch	n. b.	5,8
<i>Pergularia daemia</i>	Zweigrinde	lipophil	> 50	> 50
		methanolisch	> 50	> 50
<i>Emilia sonchifolia</i>	Oberirdische Pflanzenteile	lipophil	36,9	43,6
		methanolisch	> 50	> 50

Tab. 4: Fortsetzung

Pflanzenart	Pflanzenteil	Extrakt	IC ₅₀ -Werte (µg/ml) ^a	
			PoW	Dd2
<i>Microglossa pyrifolia</i> ^d	Oberirdische Pflanzenteile	lipophil	10,5	13,1
		methanolisch	> 50	> 50
	Wurzel	lipophil	8,3	11,4
		methanolisch	> 50	> 50
<i>Adansonia digitata</i>	Fruchtfleisch	wässrig	> 50	> 50
<i>Euphorbia hirta</i>	Kraut	lipophil	> 50	> 50
		methanolisch	> 50	> 50
<i>Phyllanthus niruroides</i>	Oberirdische Pflanzenteile	lipophil	11,5	27,3
		methanolisch	27,1	n. b.
<i>Tetrapleura tetraptera</i>	Frucht	lipophil	> 50	> 50
		methanolisch	> 50	> 50
<i>Mitragyna inermis</i>	Blatt	lipophil	> 50	34,6
		methanolisch	> 50	> 50
	Rinde	lipophil	39,6	14,6
		methanolisch	> 50	> 50
	Wurzel	lipophil	> 50	28,2
		methanolisch	> 50	> 50
<i>Mitragyna stipulosa</i>	Blatt	lipophil	32,6	20,4
		methanolisch	> 50	> 50
	Rinde	lipophil	> 50	36,1
		methanolisch	> 50	> 50
	Wurzel	lipophil	41,9	48,7
		methanolisch	> 50	> 50
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄			0,008	0,073

n. b.: nicht bestimmt, ^a: getestet als Triplikat, ^b: PE-EtOAc (1:1), ^c: MeOH (100 %), ^d: Ernte 2000

Von den elf getesteten Pflanzenarten zeigten sieben Heilpflanzen eine *in-vitro*-Wirkung gegenüber *P. falciparum* (siehe Abb. 25). Die höchste antiplasmodiale Wirkung wiesen die lipophilen Rohextrakte von *M. pyrifolia* auf mit IC₅₀-Werten von 10,5 µg/ml [PoW] und 13,1 µg/ml [Dd2] für den Extrakt der oberirdischen Pflanzenteile und IC₅₀-Werten von 8,3

$\mu\text{g/ml}$ [PoW] und $11,4 \mu\text{g/ml}$ [Dd2] für den Wurzelextrakt. Der lipophile Rohextrakt der oberirdischen Pflanzenteile von *P. niruroides* besaß eine moderate Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten mit IC_{50} -Werten von $11,5 \mu\text{g/ml}$ gegenüber PoW und $27,3 \mu\text{g/ml}$ gegenüber Dd2. Eine geringfügige antiparasitäre Aktivität zeigten die lipophilen Rohextrakte der Arten *G. celosioides*, *P. nitida*, *E. sonchifolia*, *M. pyrifolia*, *M. inermis* und *M. stipulosa* mit IC_{50} -Werten zwischen $14,5 \mu\text{g/ml}$ [PoW] und $48,7 \mu\text{g/ml}$ [Dd2]. Von den getesteten methanolischen Rohextrakten zeigten nur diejenigen von *P. niruroides* und *P. nitida* eine Aktivität, wobei *P. nitida* (Rinde) mit einem IC_{50} -Wert von $5,8 \mu\text{g/ml}$ [Dd2] die höchste antiplasmodiale Wirkung aufwies. Die wässrigen Auszüge aller Pflanzenarten erwiesen sich als nicht aktiv. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse der *in-vitro*-Testung wurde die Heilpflanze *M. pyrifolia* für eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung ausgewählt.

2.3 *Exostema mexicanum* GRAY

2.3.1 Phytochemische Untersuchung des lipophilen und des methanolischen Rohextraktes von *Exostema mexicanum*

Aus den Zweigen und Rindenteilen vom Stamm von *E. mexicanum* wurde durch Kaltextraktion ein lipophiler Rohextrakt (PE–EtOAc 1:1) gewonnen, der aufgrund seiner antiplasmodialen Aktivität (IC_{50} -Wert: $11,5 \mu\text{g/ml}$ [Dd2], $9,0 \mu\text{g/ml}$ [PoW]) über einer Kieselgelsäule aufgetrennt wurde. Die erhaltenen Fraktionen 7–9 erwiesen sich als biologisch aktiv und wurden weiter aufgearbeitet (siehe Kap. 5.6.).

Mit dem Ziel weitere möglicherweise biologisch aktive Verbindungen zu isolieren, wurde die Aufarbeitung des inaktiven methanolischen Rohextraktes von *E. mexicanum* durchgeführt. Die Fraktionierung erfolgte über eine offene Kieselgelsäule und führte zu den antiplasmodial aktiven Fraktionen 2–5 (siehe Kap. 5.6.). Aus dem unbehandelten Pflanzenmaterial von *E. mexicanum*, welches nach den phytochemischen Untersuchungen des lipophilen und methanolischen Rohextrakts zur Verfügung stand, wurde ein wässriger Auszug hergestellt (siehe Kap. 5.5.3.3.). Dieser erwies sich als nicht antiplasmodial aktiv. Eine anschließende Fraktionierung war aufgrund der geringen Substanzmenge nicht möglich.

2.3.1.1 Isolierung und Strukturaufklärung von 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (1)

Aus Fraktion 7 des lipophilen Rohextraktes wurde mittels präparativer HPLC die Verbindung **1** isoliert. Zur Strukturaufklärung wurden EI-Massenspektren, ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und NOE-Spektren herangezogen (siehe Kap. 5.7.1.). Im EI-Massenspektrum war ein deutlicher Molekülion-Peak bei m/z 314 erkennbar. Ein weiterer Peak bei m/z 286 wies auf die Abspaltung einer Carbonyleinheit hin. Die im ^1H -NMR-Spektrum (Aceton- D_6) erkennbaren Signale bei δ 6,86 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H-5'), 6,85 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2') und 6,69 ppm (1H, *dd*, $J = 8$ Hz, 2 Hz, H-6') wiesen auf ein 1,2,4-trisubstituiertes aromatisches System hin. Die Dubletts bei δ 6,56 ppm (1H, $J = 2$ Hz, H-8) und 6,43 ppm (1H, $J = 2$ Hz, H-6) deuteten auf einen weiteren Aromaten hin mit zwei zueinander *meta*-ständigen Protonen. Das Singulett bei δ 8,00 ppm (2H) ließ vermuten, dass es sich bei zwei der Substituenten um Hydroxygruppen handelte. Die beiden Singulett bei δ 3,92 ppm und 3,56 ppm (jeweils 3H) wiesen auf zwei Methoxygruppen hin, was mit Hilfe von ^{13}C -NMR- und DEPT-Spektren (Aceton- D_6) durch Signale bei δ 56,3 ppm (C-5-OCH₃) und 56,1 ppm (C-7-OCH₃) bestätigt werden konnte. Die restlichen Signale konnten zwölf aromatischen und zwei olefinischen C-Atomen, sowie einem Carbonyl-C-Atom zugeordnet werden. Diese Daten, zusammen mit einem im ^1H -NMR-Spektrum auftretenden Singulett bei δ 5,85 ppm (1H, H-3), ließen vermuten, dass es sich bei **1** um ein 4-Phenylcumarin (Neoflavon) handelte. Bei den durchgeführten NOE-Messungen führte die Einstrahlung in die Signale bei δ 3,92 ppm und 3,56 ppm zur Anhebung der Signale bei δ 6,56 ppm (H-8) und 6,43 ppm (H-6). Aus der Gesamtheit der Spektraldaten wurde für **1** die Struktur eines 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarins postuliert. Im Vergleich mit Literaturdaten konnte dies bestätigt werden (Delle Monache *et al.*, 1983). 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin wurde erstmalig aus *Coutarea hexandra* (JACQ.) SCHUM. (Rubiaceae) isoliert (Delle Monache *et al.*, 1983). Aus den biologisch aktiven Fraktionen 4 und 5 des methanolischen Rohextraktes von *E. mexicanum* konnte mittels präparativer HPLC ebenfalls Verbindung **1** isoliert werden.

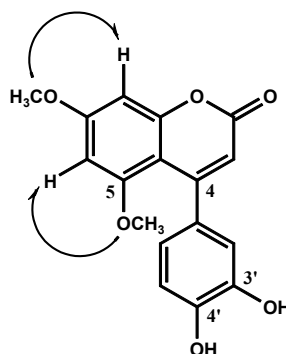


Abb. 26: Strukturformel von 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (1) mit ausgewählten NOE-Korrelationen

2.3.1.2 Isolierung und Strukturaufklärung von 4'-Hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (2)

Desweiteren konnte aus der aktiven Fraktion 7 des lipophilen Rohextraktes durch präparative HPLC die Verbindung **2** isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels EI-Massenspektren, ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und NOE-Spektren (siehe Kap. 5.7.2.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 298 und einen weiteren Peak bei m/z 270, der auf die Abspaltung einer Carbonyleinheit hinwies. Die im ^1H -NMR-Spektrum (Aceton- D_6) auftretenden Signale bei δ 7,20 ppm (2H, *d*, $J = 8$ Hz, H-3', H-5') und 6,87 ppm (2H, *d*, $J = 8$ Hz, H-2', H-6') deuteten auf ein aromatisches AA'BB'-System hin. Die beiden Dubletts bei δ 6,56 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-8) und 6,42 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-6) wurden einem 1,2,3,5-tetrasubstituierten Aromaten zugeordnet. Die beiden Singulets bei δ 3,93 ppm (3H, OCH_3 -4') und 3,55 ppm (3H, OCH_3 -5) wiesen auf die Anwesenheit zweier Methoxygruppen hin. Im ^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3) lagen im Tieffeldbereich die Signale für zwölf aromatische und zwei olefinische C-Atome, sowie für ein Carbonyl-C-Atom. Die im Hochfeld auftretenden Signale (δ 56,0 ppm und 55,8 ppm) konnten den Methoxy-C-Atomen an den Positionen 4' und 5 zugeordnet werden. Die Spektraldaten zusammen mit einem im ^1H -NMR-Spektrum auftretenden Singulett bei δ 5,85 ppm (1H, H-3) führten zu der Annahme, dass es sich bei **2** ebenfalls um ein 4-Phenylcumarin handelte. Die NOE-Spektren zeigten, dass beide Methoxygruppen Korrelationen zu den *meta*-ständigen Protonen bei δ 6,56 ppm (H-8) und 6,42 ppm (H-6) aufwiesen. Aufgrund der Spektraldaten konnte für **2** die Molekülstruktur von 4'-Hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin postuliert werden. Durch Literaturdaten wurde dies bestätigt (Delle Monache *et al.*, 1983). 4'-Hydroxy-5,7-

dimethoxy-4-phenylcumarin wurde erstmalig aus *Coutarea hexandra* isoliert (Delle Monache *et al.*, 1983). Aus Fraktion 2 des methanolischen Rohextraktes von *E. mexicanum* konnte mittels präparativer HPLC ebenfalls Verbindung **2** isoliert werden.

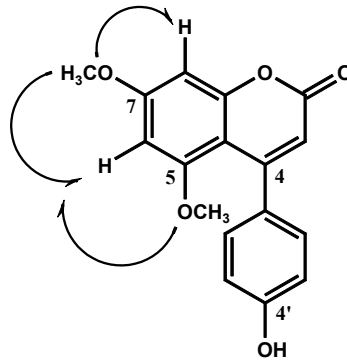


Abb. 27: Strukturformel von 4'-Hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (2) mit ausgewählten NOE-Korrelationen

2.3.1.3 Isolierung und Strukturaufklärung von 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin [O-Methyl-exostemin] (3)

Die nach der HPLC-Trennung verbliebene Restfraktion 7A des lipophilen Rohextraktes wurde mittels einer offenen Sephadexsäule weiter aufgearbeitet. Die erhaltene aktive Fraktion 7A/1 (IC₅₀-Wert: 3,5 µg/ml [Dd2]) wurde durch präparative HPLC aufgereinigt, was zur Isolierung der Verbindung **3** führte (siehe Kap. 5.7.3.). Die Strukturaufklärung erfolgte mittels EI-Massenspektren, ¹H-NMR-Spektren und durch Vergleich mit den bisher isolierten Naturstoffen **1** und **2** aus *E. mexicanum*. Das EI-Massenspektrum zeigte einen deutlichen Molekülion-Peak bei *m/z* 342 und einen weiteren Peak bei *m/z* 327, der auf die Abspaltung einer Methyleinheit hinwies. Die im ¹H-NMR-Spektrum (MeOD) auftretenden Signale bei δ 7,24 ppm (2H, *d*, *J* = 8 Hz, H-2', H-6') und 6,95 ppm (2H, *d*, *J* = 8 Hz, H-3', H-5') wiesen auf ein aromatisches AA'BB'-System hin. Ein Vergleich mit den ¹H-NMR-Spektren bisher isolierter Verbindungen ließ vermuten, dass das Singulett bei δ 6,56 ppm (1H, H-6) einem 1,2,3,5,6-pentasubstituierten Aromaten zuzuordnen ist. Die Signale bei δ 3,98 ppm (3H, *s*, OCH₃), 3,86 ppm (3H, *s*, OCH₃), 3,85 ppm (3H, *s*, OCH₃) und 3,51 ppm (3H, *s*, OCH₃) zeigten vier Methoxygruppen an. Die Spektraldaten deuteten daraufhin, dass Verbindung **3** 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin entsprach. Durch einen Vergleich der NMR-Daten mit Literaturangaben konnte dies bestätigt werden (Sánchez-Viesca, 1969). Es handelt sich hierbei um einen neuen Naturstoff, der zuvor nur

als Partialsynthetikum [O-Methyl-exostemin] ausgehend von 8'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin [Exostemin] gewonnen werden konnte (Sánchez-Viesca, 1969).

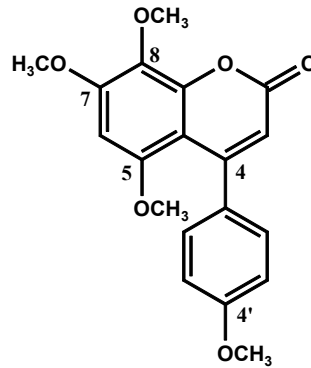


Abb. 28: Strukturformel von 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin [O-Methyl-exostemin] (3)

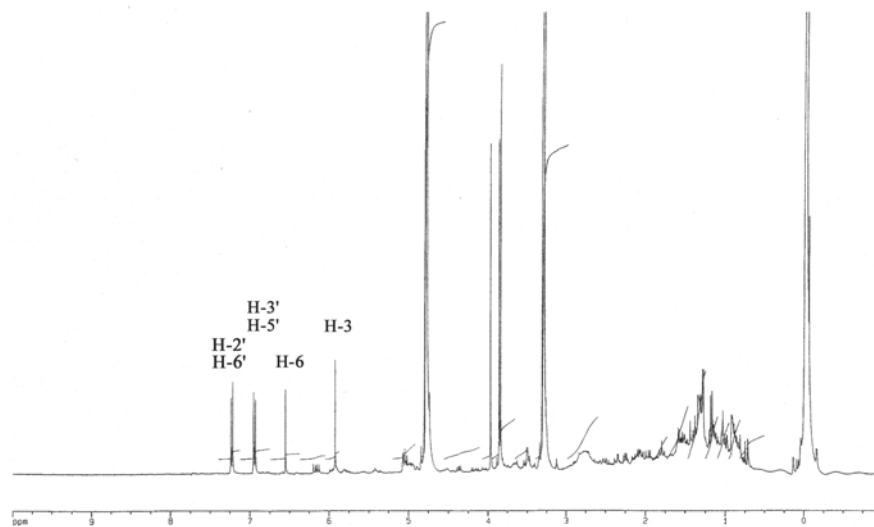


Abb. 29: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) von 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin [O-Methyl-exostemin] (3)

2.3.1.4 Isolierung und Strukturaufklärung von 4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin [Exomexin A] (4)

Aus der aktiven Fraktion 8 (IC_{50} -Wert: 5,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [Dd2]) des lipophilen Rohextraktes konnte mittels präparativer HPLC die Verbindung 4 isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte durch EI-Massenspektren, HR-MS-Messungen und ^1H -

NMR-, ^{13}C -NMR- und NOE-Spektren (siehe Kap. 5.7.4.). Im EI-Massenspektrum war ein deutlicher Molekülion-Peak bei m/z 314 erkennbar. Die HR-MS-Messung ergab die Summenformel $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$. Im EI-Massenspektrum deutete der Peak bei m/z 299 auf eine Methylabspaltung, ein weiterer bei m/z 286 auf eine Carbonylabspaltung hin. Im ^1H -NMR-Spektrum (Aceton- D_6) wiesen auftretende Singulets bei δ 8,51 ppm (1H) und 7,74 ppm (1H) auf zwei Hydroxygruppen sowie bei δ 3,97 ppm (3H, s, OCH_3 -7) und 3,50 ppm (3H, s, OCH_3 -5) auf zwei Methoxygruppen hin. Zwei Dubletts bei 7,20 ppm (2H, $J = 8$ Hz, H-2', H-6') und 6,87 ppm (2H, $J = 8$ Hz, H-3', H-5') zeigten ein aromatisches AA'BB'-System an. Das Signal bei δ 6,64 ppm (1H, s, H-6) wies auf einen 1,2,3,5,6-pentasubstituierten Aromaten hin. Aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum (MeOD) ging die Anwesenheit zweier Methoxygruppen hervor (δ 57,0 ppm und 56,7 ppm). Die restlichen fünfzehn Signale konnten zwölf aromatischen und zwei olefinischen C-Atomen, sowie einem Carbonyl-C-Atom zugeordnet werden. Aus den NOE-Spektren war ersichtlich, dass beide Methoxygruppen Korrelationen zu dem Proton bei δ 6,64 ppm (H-6) zeigten. Aus den vorhandenen spektroskopischen Daten konnte geschlussfolgert werden, dass **4** einem 4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin entsprach. Es handelte sich hierbei um einen neuen Naturstoff, den wir als Exomexin A bezeichneten. Aus den biologisch aktiven Fraktionen 3, 4 und 5 des methanolischen Rohextraktes von *E. mexicanum* konnte mittels präparativer HPLC ebenfalls 4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin [Exomexin A] (**4**) isoliert werden.

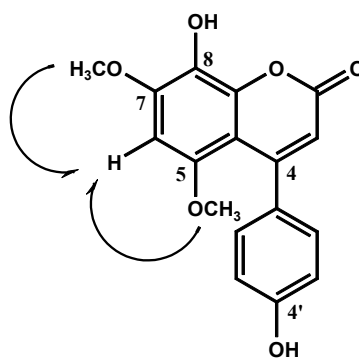


Abb. 30: Strukturformel von 4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin [Exomexin A] (4**) mit ausgewählten NOE-Korrelationen**

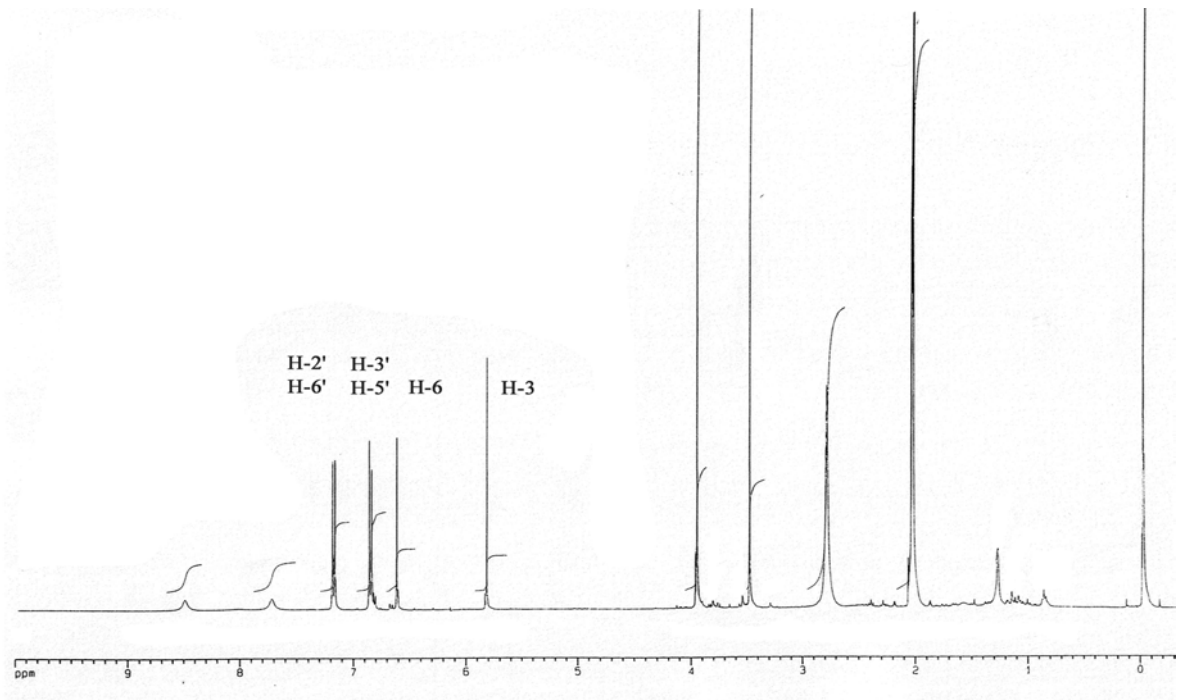


Abb. 31: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, Aceton- D_6) von
4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin [Exomexin A] (4)

2.3.1.5 Isolierung und Strukturaufklärung von 3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcoumarin [Exomexin B] (5)

Aus der aktiven Fraktion 9 (IC_{50} -Wert: 5,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [Dd2]) des lipophilen Rohextraktes wurde durch präparative HPLC-Trennung die Verbindung **5** isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels EI-Massenspektren, HR-MS-Messungen und ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und NOE-Spektren (siehe Kap. 5.7.5.). Im EI-Massenspektrum war ein Moleküllion-Peak bei m/z 344 erkennbar. Die HR-MS-Messung ergab die Summenformel $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$. Ein weiterer Peak des EI-Massenspektrums bei m/z 329 wies auf die Abspaltung einer Methylgruppe hin. Im ^1H -NMR-Spektrum (Aceton- D_6) deuteten auftretende Singulets bei δ 8,09 ppm (1H) und 8,11 ppm (1H) auf zwei Hydroxygruppen sowie bei δ 3,99 ppm (3H, OCH_3 -7), 3,83 ppm (3H, OCH_3 -8) und 3,57 ppm (3H, OCH_3 -5) auf drei Methoxygruppen hin. Die Signale bei δ 6,85 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H-5'), 6,83 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2') und 6,68 ppm (1H, *dd*, $J = 8$ Hz, 2 Hz, H-6') wiesen auf ein 1,3,4-trisubstituiertes aromatisches System hin. Das Singulett bei δ 6,63 ppm (1H, H-6) wurde einem 1,2,3,5,6-pentasubstituierten Aromaten zugeordnet. Ein Vergleich mit bisher isolierten Verbindungen ergab, dass es sich bei **5** um einen 3',4',5,7,8-pentasubstituierten 4-Phenylcoumarin handelte. NOE-Messungen zeigten, dass die beiden Methoxygruppen

bei δ 3,99 ppm und 3,57 ppm Korrelationen zu dem Proton bei δ 6,63 ppm (H-6) zeigten. Daraus konnte geschlossen werden, dass **5** dem 3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcumarin entsprach. Es handelte sich hierbei um einen neuen Naturstoff, den wir als Exomexin B bezeichneten. Die Verbindung **5** konnte mittels präparativer HPLC ebenfalls aus der antiplasmodial aktiven Fraktion 5 des methanolischen Rohextraktes isoliert werden.

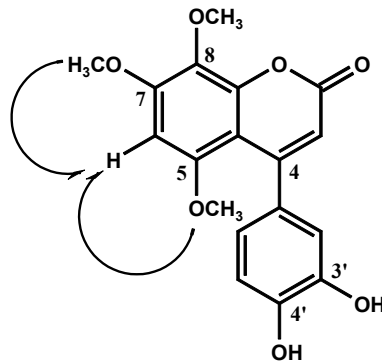


Abb. 32: Strukturformel von 3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcumarin [Exomexin B] (5**) mit ausgewählten NOE-Korrelationen**

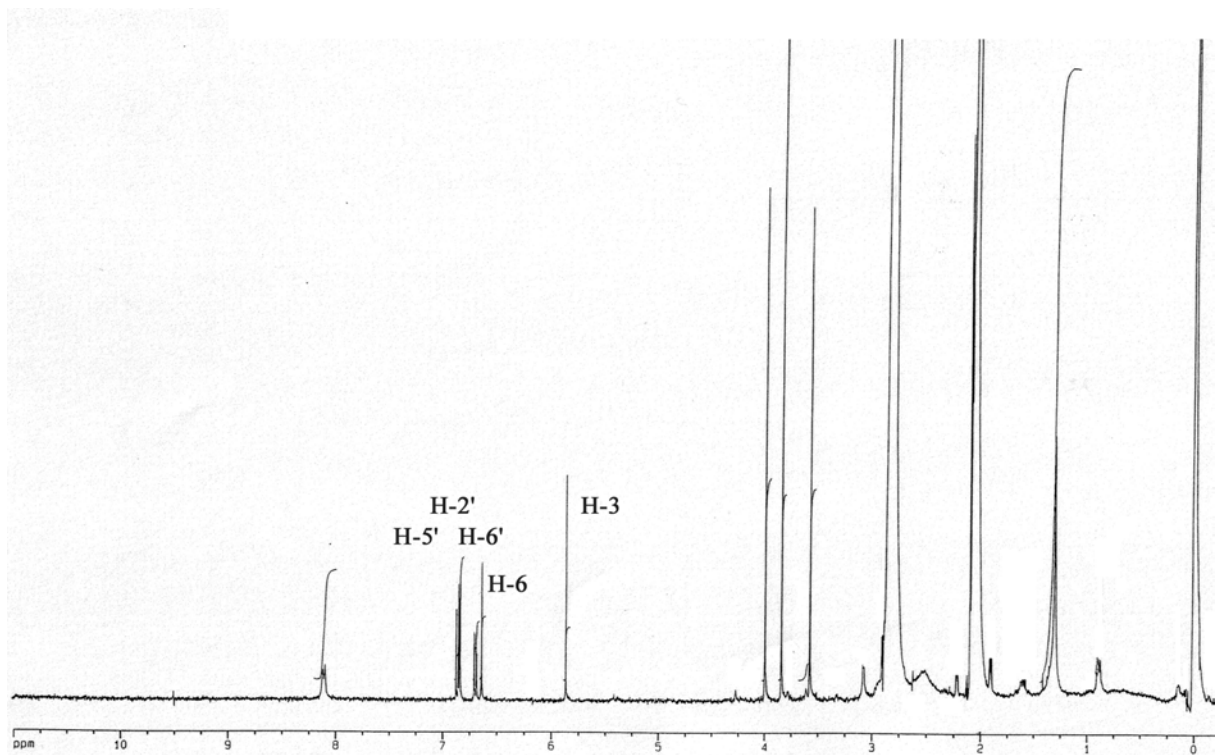


Abb. 33: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, Aceton-D₆) von 3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcumarin [Exomexin B] (5**)**

2.3.1.6 Isolierung und Strukturaufklärung von 3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (6)

Durch präparative HPLC konnte aus Fraktion 9 des lipophilen Rohextraktes weiterhin die Verbindung **6** erhalten werden. Die Molekülstruktur wurde aufgeklärt mittels EI-Massenspektren, ^1H -NMR und NOE-Spektren (siehe Kap. 5.7.6.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 330 und einen weiteren Peak bei m/z 302, der auf die Abspaltung einer Carbonyleinheit hinwies. Im ^1H -NMR-Spektrum (Aceton- D_6) deuteten Signale bei δ 6,85 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H-5'), 6,83 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2') und 6,69 ppm (1H, *dd*, $J = 8$ Hz, 2 Hz, H-6') auf einen 1,3,4-trisubstituierten Aromaten hin. Die NMR-Signale, zusammen mit den Singulettis bei δ 6,64 ppm (1H, H-6) und 5,84 ppm (1H, H-3), wiesen auf ein 3',4',5,7,8-pentasubstituiertes 4-Phenylcumarin hin. Zwei weitere Singulettis bei δ 3,97 ppm (3H, OCH_3 -7) und 3,51 ppm (3H, OCH_3 -5) wurden zwei Methoxygruppen zugeordnet, deren Position durch NOE-Messungen bestimmt wurden: beide Methoxygruppen zeigten Korrelationen zu H-6 bei δ 6,64 ppm. Daraus wurde geschlossen, dass **6** dem 3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin entsprach. Aus der Literatur ging hervor, dass dieser Naturstoffe zuvor aus *Coutarea hexandra* isoliert wurde (D'Agostino *et al.*, 1989).

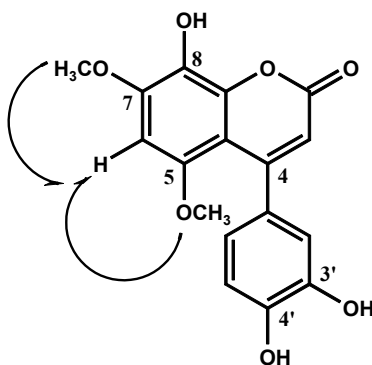


Abb. 34: Strukturformel von 3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (6) mit ausgewählten NOE-Korrelationen

2.3.1.7 Isolierung und Strukturaufklärung von 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (7)

Aus Fraktion 2 des methanolischen Rohextraktes von *E. mexicanum* konnte durch präparative HPLC die Verbindung **7** gewonnen werden (siehe Kap. 5.7.7.). Das EI-

Massenspektrum zeigte einen Molekülion–Peak bei m/z bei 328 und einen weiteren Peak bei m/z 300, der auf die Abspaltung einer Carbonyleinheit hinwies. Im ^1H –NMR–Spektrum (Aceton– D_6) zeigten Signale bei δ 8,53 ppm (1H, s) eine Hydroxygruppe und bei δ 3,93 ppm (3H, s , OCH_3 –7), 3,90 ppm (3H, s , OCH_3 –4') und 3,55 ppm (3H, s , OCH_3 –5) drei Methoxygruppen an. Das charakteristische Kopplungsmuster der Signale bei δ 6,97 ppm (1H, d , $J = 8$ Hz, H–5'), 6,82 ppm (1H, d , $J = 2$ Hz, H–2') und 6,78 ppm (1H, dd , $J = 8$ Hz, 2 Hz, H–6') deutete auf einen 1,3,4–trisubstituierten Aromaten hin. Dubletts bei δ 6,56 ppm (1H, d , $J = 2$ Hz, H–8) und 6,42 ppm (1H, d , $J = 2$ Hz, H–6) führten zu der Schlussfolgerung, dass **7** einem 3',4',5,7–tetrasubstituierten 4–Phenylcumarin entsprach. Da die Verschiebung der Signale bei δ 6,56 ppm (H–8) und 6,42 ppm (H–6) denen der Verbindung **1** sehr ähnlich waren, wurde vermutet, dass sich bei **7** ebenfalls an Position C–5 und C–7 Methoxygruppen befinden. Im NOE–Spektrum waren Korrelation zwischen dem Proton H–5' bei δ 6,97 ppm und der Methoxygruppe bei δ 3,90 ppm (OCH_3 –4') sichtbar, woraus zu schlussfolgern war, dass sich an C–4' eine weitere Methoxygruppe befand. Anhand aller Spektraldaten wurde postuliert, dass es sich bei Verbindung **7** um 3'–Hydroxy–4',5,7–trimethoxy–4–phenylcumarin handelte. Ein Vergleich mit Literaturangaben konnte dies bestätigen. Der Naturstoff 3'–Hydroxy–4',5,7–trimethoxy–4–phenylcumarin wurde zuvor aus *Coutarea hexandra* isoliert (Delle Monache *et al.*, 1983). Aus der biologisch aktiven Fraktion 3 des methanolischen Rohextraktes konnte mittels präparativer HPLC ebenfalls Verbindung **7** isoliert werden.

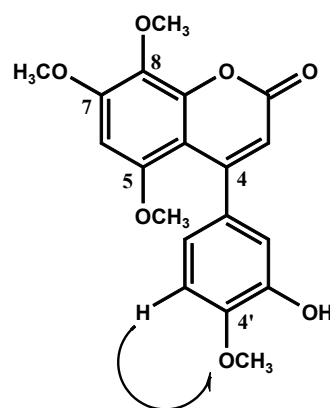


Abb. 35: Strukturformel von 3'–Hydroxy–4',5,7–trimethoxy–4–phenylcumarin (7) mit ausgewählten NOE–Korrelationen

2.3.2 Antiplasmodiale Aktivität der Rohextrakte und der isolierten Verbindungen

Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität der Rohextrakte

Von allen Rohextrakten der Zweige und Rindenteile vom Stamm von *E. mexicanum* wurde die *in-vitro*-Aktivität gegenüber einem Chloroquin-sensiblen Stamm [PoW] und einem multiresistenten Klon [Dd2] von *Plasmodium falciparum* getestet und die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert) bestimmt. Rohextrakte mit einem IC₅₀-Wert > 50 µg/ml wurden als inaktiv angesehen (O'Neill *et al.*, 1985). Zusätzlich wurde am Beispiel des lipophilen und methanolischen Rohextraktes untersucht, ob eine Verlängerung der Testdauer von 42 auf 72 Stunden einen Einfluß auf die Hemmwirkung ausübt (Tabelle 5).

Tab. 5:

Antiplasmodiale *in-vitro*-Aktivität der Rohextrakte von *Exostema mexicanum* gegenüber *Plasmodium falciparum*

Rohextrakte der Zweige und Rindenteile von <i>E. mexicanum</i>	IC ₅₀ -Werte (µg/ml) ^a nach 42 h		IC ₅₀ -Werte (µg/ml) nach 72 h	
	PoW	Dd2	PoW	Dd2
Lipophiler Extrakt (PE-EtOAc 1:1)	9,0	11,5	8,5	5,1
Methanolischer Extrakt (MeOH 100 %)	> 50	> 50	19,4	32,1
Wässriger Auszug	> 50	> 50	n.b.	n.b.
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	0,008	0,073	0,004	0,02

^a: getestet als Triplikat

n.b.: nicht bestimmt

Der lipophile Rohextrakt der Zweige und Rindenteile vom Stamm von *E. mexicanum* erwies sich als aktiv mit IC₅₀-Werten von 9,0 µg/ml [PoW] und 11,5 µg/ml [Dd2]. Die antiplasmodiale Hemmwirkung der Droge konnte somit *in vitro* bestätigt werden.

Die Daten in Tabelle 5 zeigen, dass eine Verlängerung der Testdauer auf 72 Stunden zu keiner Erhöhung bzw. Verminderung der Aktivität des lipophilen Rohextraktes führte. Beim methanolischen Rohextrakt machte sich eine Testverlängerung positiv bemerkbar: nach 72stündiger Exposition zeigte sich eine moderate Hemmwirkung von 19,4 µg/ml [PoW] und 32,1 µg/ml [Dd2]. Es wurde vermutet, dass dieser verzögerte Wirkungseintritt

auf Verbindungen zurückzuführen ist, die erst nach einem bestimmten Zeitraum eine biologische Aktivität aufweisen,

Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität der isolierten Verbindungen

Die aus *E. mexicanum* isolierten 4-Phenylcumarine wurden jeweils als Triplikat gegenüber PoW und Dd2 getestet. Für alle isolierten Naturstoffe wurde die antiplasmodiale Hemmwirkung wie folgt bewertet:

IC₅₀-Wert ≤ 20 µM: sehr gute Aktivität,

IC₅₀-Wert ≤ 50 µM: moderate Wirkung,

IC₅₀-Wert ≤ 100 µM: geringfügige Hemmwirkung und

IC₅₀-Wert > 100 µM: keine antiparasitäre Aktivität.

Tab. 6:

Antiplasmodiale *in-vitro*-Aktivität der isolierten Verbindungen aus *Exostema mexicanum* gegenüber *Plasmodium falciparum*

Isolierte Verbindungen aus <i>E. mexicanum</i>	IC ₅₀ -Werte ^a			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (1)	26,6	84,6	7,9	25,1
4'-Hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (2)	> 50	> 168	> 50	> 168
4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin (3)	3,6	10,5	1,6	4,7
4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (4)	41,5	132,0	16,5	52,5
3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcumarin (5)	40,5	117,6	14,0	40,7
3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (6)	31,0	93,9	18,0	54,5
3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (7)	> 50	> 152	> 50	> 152
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	0,008	0,015	0,073	0,14

^a: getestet als Triplikat

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich zeigten von den sieben isolierten Naturstoffen aus *E. mexicanum* die Verbindungen **1**, **3**, **4**, **5** und **6** eine antiparasitäre Hemmwirkung. 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin [O-Methyl-exostemin] (**3**) besaß die stärkste Wirkung gegenüber *P. falciparum* mit IC₅₀-Werten von 10,5 µM [PoW] und 4,7 µM [Dd2]. Vermutlich ist die antiplasmodiale Aktivität auf den lipophilen Charakter der Verbindung

zurückzuführen. Möglicherweise kann der Wirkstoff aufgrund seiner erhöhten Lipophilie leichter die Zellmembran der Erythrozyten und auch die des Parasiten passieren. Die Verbindungen **1**, **4**, **5** und **6** zeigten eine moderate bis geringe antiplasmodiale Hemmwirkung mit IC_{50} -Werten zwischen 25,1 μ M und 54,5 μ M (jeweils Dd2). Die Phenylcumarine **2** und **7** erwiesen sich gegenüber dem Parasiten als inaktiv. Interessanterweise besaßen alle biologisch aktiven Phenylcumarine geringere IC_{50} -Werte gegenüber dem Chloroquin-resistenten Klon [Dd2]. Ein ähnliches Phänomen wurde für Bisindolalkaloide beschrieben, die aus verschiedenen *Alstonia*-Arten isoliert wurden (Keawpradub *et al.*, 1999). Keawpradub und Mitarbeiter postulierten unterschiedliche Substanz-Parasiten-Interaktionen für den von ihnen verwendeten Chloroquin-sensiblen Stamm T9-96 und den multiresistenten Stamm K1. Es wäre somit zu vermuten, dass die Substanzen gegenüber dem Parasiten ein anderes Wirkungsprofil besitzen als Chloroquin. Da aus allen aktiven Fraktionen Phenylcumarine isoliert wurden, vermuten wir, dass diese Naturstoffe für die antiplasmodiale Wirkung von *E. mexicanum* verantwortlich sind

2.3.3 Antiplasmodiale Aktivität von 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**1**) in Gegenwart von $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$

Der isolierte Naturstoff 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**1**) wurde für eine weiterführende Untersuchung ausgewählt, um Informationen über einen möglichen Wirkmechanismus der Verbindung zu erhalten.

Wirkung von Eisenchelatoren gegenüber *P. falciparum*:

Eisen ist essentiell für das Wachstum und die Vermehrung des Parasiten. Hierbei ist u.a. das eisenhaltige Enzym Ribonukleotidreduktase zu erwähnen, welches bei der DNA-Synthese von Bedeutung ist (Hider *et al.*, 1997). Aus früheren Studien ist bekannt, dass einige Eisenchelatoren in der Lage sind, selektiv diese eisenhaltigen Metallenzyme irreversibel zu inhibieren und somit bestimmte Stadien des Parasitenwachstums zu hemmen. Dies führt unter anderem zu:

- vermindertem Zellwachstum,
- verminderter Replikation des Parasiten aufgrund des vorherrschenden Fe-Mangels
- Zellschäden, die durch toxisch wirkende Fe-Chelatkomplexe verursacht werden (Cabantchik *et al.*, 1996).

Diese Fe–Chelatoren sind meist lipophiler Natur und weisen funktionelle Gruppen mit Komplexierungsvermögen auf, wie z.B. aromatische *ortho*–ständige Hydroxygruppen, 1,3–Diole und β –Hydroxyketone (Cabantchik *et al.*, 1996).

Ein Beispiel für einen solchen Fe–Chelator ist der Arzneistoff Deferoxamin (Desferal[®]). Es handelt sich hierbei um eine aus Aktinomyzeten (grampositive Bakterien) gewonnene Base, die bei akuten Eisenvergiftungen verabreicht wird. Deferoxamin ist in der Lage, Eisenionen in einen gut wasserlöslichen Komplex zu überführen, der durch die Nieren ausgeschieden wird (Mutschler, 1996). Weiterhin konnte für diesen Arzneistoff eine antiplasmodiale Wirkung festgestellt werden. In verschiedenen *in-vitro*– und *in-vivo*–Studien hemmte Deferoxamin das Wachstum der erythrozytären und hepatozytischen Entwicklungsstadien von *P. falciparum* (Pradines *et al.*, 1996). In unserem Testsystem zeigte Deferoxaminmesilat[®] (SIGMA) eine antiplasmodiale Aktivität von 12,6 μ M gegenüber PoW und 9,3 μ M gegenüber Dd2.

Untersuchung des Fe–chelatisierenden Effekts von 3',4'–Dihydroxy–5,7–dimethoxy–4–phenylcumarin (1)

Im Laufe dieser Untersuchung sollte festgestellt werden, ob das 4–Phenylcumarin (1) mit seinen *ortho*–ständigen Hydroxygruppen einen chelatisierenden Effekt auf eisenhaltige Metallenzyme des Parasiten ausübt. Ein Beispiel für Naturstoffe mit *ortho*–ständigen Hydroxygruppen im Molekül, die Fe– Komplexe bilden können, sind Vertreter der Anthocyanidine. So sind die in Position 3' und 4' hydroxylierten Verbindungen Cyanidin und Delphinidin befähigt, mit Eisenionen tiefblaue Komplexe auszubilden (Teuschner, 1997).

Um einen möglichen Fe–chelatisierenden Effekt von 3',4'–Dihydroxy–5,7–dimethoxy–4–phenylcumarin (1) experimentell untersuchen zu können, wurde die antiplasmodiale Aktivität der Verbindung in Gegenwart von $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ bestimmt. Bei einer chelatisierenden Wirkung von 1 wäre zu erwarten, dass sich die Hemmwirkung von 1 verringert, da durch die Fe–Zugabe die funktionellen Gruppen besetzt würden und für die parasiteneigenen Enzyme ausreichend Eisen zur Verfügung stünde. Somit sollte ein 1:1–Gemisch aus 3',4'–Dihydroxy–5,7–dimethoxy–4–phenylcumarin (1) und $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ einen höheren IC_{50} –Wert besitzen, als das reine 4–Phenylcumarin 1. Der Versuch wurde auf dem Chloroquin–resistenten Klon Dd2 von *P. falciparum* durchgeführt. Mittels einer zusätzlich durchgeführten Positivkontrolle (150 μ l Testmedium und 10 μ l der verdünnten

Stammlösung von $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ [m/V]) konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Plasmodien nicht durch $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ beeinflusst wurde.

Tab. 7:

Antiplasmodiale Aktivität von 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (1) in Gegenwart von $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ gegenüber dem Chloroquin-resistenten Klon Dd2

Getestete Verbindungen	IC ₅₀ -Werte [Dd2] ^a	
	µg/ml	µM
3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (1)	5,5	17,5
3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (1) und $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (1:1, M/M)	3,3	10,5
Chloroquin $\times 2 \text{H}_3\text{PO}_4$	0,073	0,14

^a: getestet als Triplikat

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, besaß das 1:1-Gemisch aus 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (1) und $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ keinen höheren IC₅₀-Wert als die reine Verbindung 1. Somit ist nicht zu vermuten, dass die Hemmwirkung von 1 auf einem Fe-chelatisierenden Mechanismus zwischen dem Phenylcumarin und eisenhaltigen Metallenzymen von *P. falciparum* beruht. Im Rahmen des hier beschriebenen Versuches wurde für die reine Verbindung 1 ein niedrigerer IC₅₀-Wert ermittelt (5,5 µg/ml [Dd2]), als der in Kap. 2.3.2. für 1 angegebene IC₅₀-Wert (7,9 µg/ml [Dd2]). Dies ist auf biologische Schwankungen innerhalb des *in-vitro*-Testsystems, wie z.B. unterschiedliche Wachstumsraten der Plasmodien an beiden Testtagen, zurückzuführen.

Aufgrund der geringen Substanzmengen war eine Wiederholung des Versuch mit 3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcumarin (5) sowie mit 3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (6) nicht möglich.

2.3.4 Zytotoxische Wirkung der isolierten Verbindungen

Von den antiplasmodial aktiven Verbindungen aus *E. mexicanum* wurde die zytotoxische Wirkung an der humanen Endothelzelllinie ECV 304 untersucht (siehe Kap. 5.3.1.). Ziel der Untersuchung war es, festzustellen, ob die *in-vitro*-Aktivität der Phenylcumarine auf

einer spezifischen Hemmung von *P. falciparum* beruht, bzw. ob eine allgemeine Zelltoxizität vorliegt. Zusätzlich wurde der Selektivitätsindex (SI) ermittelt. Dieser ist als Quotient aus der zytotoxischen über die antiplasmodiale Aktivität definiert (Angerhofer *et al.*, 1992):

$$IC_{50}\text{-Wert (ECV 304)} / IC_{50}\text{-Wert (}P. falciparum\text{)} = \text{Selektivitätsindex (SI)}$$

Mit Hilfe des Selektivitätsindex kann abgeschätzt werden, wie selektiv die Testsubstanz auf den Parasiten wirkt. Für bekannte Anti-Malariamittel, wie Artemisinin, liegt der SI-Index > 1000 . Dagegen weisen Verbindungen, die eine allgemeine Zelltoxizität besitzen, einen $SI < 10$ auf (Angerhofer *et al.*, 1992).

Für alle getesteten Verbindungen wurde die zytotoxische Wirkung wie folgt interpretiert:

$IC_{50}\text{-Wert} \leq 30 \mu\text{M}$: stark zytotoxisch,

$IC_{50}\text{-Wert} < 100 \mu\text{M}$: moderate Zytotoxizität,

$IC_{50}\text{-Wert} > 100 \mu\text{M}$: geringfügige zytotoxische Wirkung und

$IC_{50}\text{-Wert} > 300 \mu\text{M}$: kein zytotoxischer Effekt.

Tab. 8:

Zytotoxische Wirkung einiger isolierter Verbindungen aus *Exostema mexicanum* gegenüber der Zelllinie ECV 304

Isolierte Verbindungen aus <i>E. mexicanum</i>	IC ₅₀ -Werte (μM) ^a		SI ^b
	ECV 304	Dd2	
3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (1)	10,2	25,1	0,40
4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin (3)	1,2	4,7	0,25
4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (4)	5,1	52,5	0,10
3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcumarin (5)	1,6	40,7	0,04
3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (6)	10,0	54,5	0,18
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	57,5	0,14	411,0

^a: Zahl der Experimente: 8 (ECV 304), 3 (Dd2)

^b: Selektivitätsindex (SI) ist definiert als Quotient aus der zytotoxischen und der antiplasmodialen Aktivität

Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, zeigten alle getesteten 4-Phenylcumarine eine starke zytotoxische Aktivität gegenüber der humanen Endothelzelllinie ECV 304 mit IC₅₀-Werten zwischen 1,2 und 10,2 μM. Die Hemmwirkung gegenüber dem Chloroquin-

resistenten Klon Dd2 war im Vergleich vier bis sechszwanzigfach geringer. Der SI-Index lag für alle Verbindungen bei $SI \leq 0,40$. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die *in-vitro*-Aktivität der 4-Phenylcumarine auf eine allgemeine Membrantoxizität zurückzuführen ist. Die gefundenen Resultate stimmen überein mit einer früheren Studie von *E. acuminatum* URB.: die aus den Wurzeln isolierten 4-Phenylcumarine erwiesen sich als zytotoxisch gegenüber Zelllinien verschiedener Humankarzinome (Ito *et al.*, 2000). Bei einer dieser Verbindungen handelt es sich um 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin, das auch im Rahmen unserer Untersuchungen an *E. mexicanum* als Verbindung 7 isoliert werden konnte. Ito und Mitarbeiter (2000) stellten in ihrer Studie für 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin eine signifikante Zytotoxizität fest. Da dieses 4-Phenylcumarin in unserem Testsystem keine antiplasmodiale Aktivität aufwies, wurde es nicht dem *in-vitro*-Zytotoxizitätstest an der Zelllinie ECV 304 zugeführt.

Die Gesamtheit der erhaltenen Daten aller isolierten 4-Phenylcumarine aus *E. mexicanum* deuten daraufhin, dass diese Naturstoffe keine spezifische Hemmung von *P. falciparum* bewirken. Aufgrund der erhöhten Zytoxizität der isolierten Verbindungen scheint eine langfristige phytotherapeutische Verwendung von *E. mexicanum* gegen Malaria als nicht geeignet.

2.4 *Calea tenuifolia* KUNTH

2.4.1 Phytochemische Untersuchung des lipophilen und des methanolischen Rohextraktes sowie eines wässrigen Auszuges von *Calea tenuifolia*

Aus den Blättern von *C. tenuifolia* wurde durch Kaltextraktion ein lipophiler Rohextrakt (PE-EtOAc 1:1) gewonnen, der aufgrund seiner antiplasmodialen Aktivität (IC_{50} -Werte: 10,4 $\mu\text{g/ml}$ [PoW], 24,3 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) an einer RP-18-Säule aufgetrennt wurde. Die erhaltenen Fraktionen 8-12 erwiesen sich als antiplasmodial aktiv und wurden weiter aufgearbeitet (siehe Kap. 5.8.). Aufgrund der antiplasmodialen Aktivität des methanolischen Rohextraktes (IC_{50} -Werte: 19,7 $\mu\text{g/ml}$ [PoW], 19,5 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) wurde eine Fraktionierung über eine RP-18-Säule (MPLC) durchgeführt. Allein die erhaltene Fraktion 5 erwies sich als biologisch aktiv und wurde weiter aufgetrennt (siehe Kap. 5.8.). Weiterhin wurde aus unbehandeltem Pflanzenmaterial ein wässriger Auszug hergestellt. Dieser erwies sich als inaktiv, jedoch führte eine Fraktionierung über eine RP-18-Säule zu den Fraktionen 10 und 11, die eine sehr schwache Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* zeigten, und deshalb weiter untersucht wurden (siehe Kap. 5.8.).

Bei der phytochemischen Aufarbeitung der Asteraceen-Art *C. tenuifolia* wäre die Isolierung von Sesquiterpenlaktonen zu erwarten gewesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten jedoch in keiner der erhaltenen Fraktionen mittels $^1\text{H-NMR}$ -Messungen Sesquiterpenlaktone detektiert werden.

2.4.1.1 Isolierung und Strukturaufklärung von 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] (**8**)

Die aktive Fraktion **8** des lipophilen Rohextraktes (IC_{50} -Wert: 9,4 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) wurde mittels präparativer HPLC aufgetrennt, wobei Verbindung **8** erhalten wurde. Zur Strukturaufklärung wurden EI-Massenspektren und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren herangezogen (siehe Kap. 5.9.1.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 314 und einen weiteren Peak bei m/z 283, der auf die Abspaltung einer Methoxygruppe hinwies. Weiterhin waren charakteristische Peaks bei m/z 162 und m/z 153 erkennbar. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) auftretende Singulett bei δ 3,96 ppm (3H) und 3,93 ppm (3H) zeigten zwei Methoxygruppen an. Die Signale bei δ 7,68 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, 8 Hz, H-6'), 7,61 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2') und 7,15 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H-5') wiesen auf ein 1,3,4-trisubstituiertes aromatisches System hin. Zwei Dubletts bei δ 6,55 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-6 oder H-8) und 6,26 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-8 oder H-6) zeigten einen 1,2,3,5-tetrasubstituierten Aromaten an. Diese Daten, einschließlich des Singulett bei δ 6,72 ppm (1H, H-3) führten zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei **8** um ein 3',4',5,7-tetrasubstituiertes Flavon handelte. Die Position der Hydroxy- und Methoxygruppen ergab sich aus den MS-Fragmente bei m/z 162 und m/z 153. In Abbildung 36 ist die für Flavone charakteristische MS-Fragmentierung dargestellt. Unter Annahme dieser typischen Bindungsspaltung zwischen Position 1 und 2 sowie zwischen 3 und 4 des Flavongrundgerüsts entsprach bei Verbindung **8** der Peak bei m/z 162 dem Fragment des B-Ringes mit zwei substituierten Methoxygruppen. Das Restmolekül, entsprechend dem Fragment des A-Ringes mit zwei substituierten Hydroxygruppen, besaß eine Masse von m/z 153.

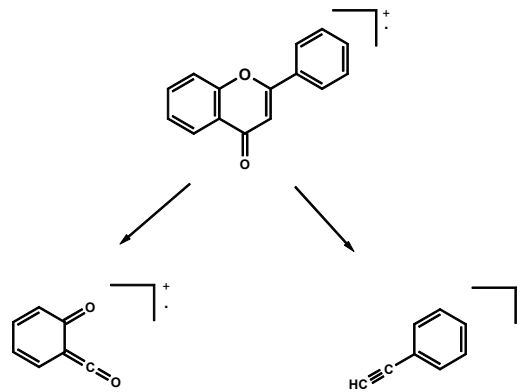


Abb. 36: MS-Fragmentierung von Flavonen nach Harborne (1975)

Ein Vergleich mit Literaturangaben bestätigte, dass **8** dem Naturstoff 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] entsprach, welches zuvor u.a. aus *Striga asiatica* (L.) O. KUNTZE (Scrophulariaceae) isoliert wurde (Nakanishi *et al.*, 1985). Aus der biologisch aktiven Fraktion 10 des lipophilen Rohextraktes von *C. tenuifolia* wurde wiederholt 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon isoliert. In Fraktion 10 des wässrigen Auszuges konnte durch $^1\text{H-NMR}$ - und MS-Spektren ebenfalls Verbindung **8** detektiert werden.

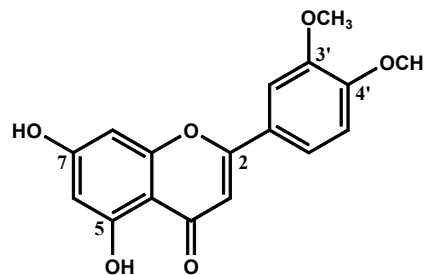


Abb. 37: Strukturformel von 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] (8)

2.4.1.2 Isolierung und Strukturaufklärung von 4',5,7-Trihydroxyflavon [Apigenin] (9)

Durch präparative HPLC-Trennung konnte aus der aktiven Fraktion 9 (IC_{50} -Wert: 17,4 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) des lipophilen Rohextraktes die Verbindung **9** isoliert werden. Zur Strukturaufklärung wurden EI-Massenspektren und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren herangezogen (siehe Kap. 5.9.2.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Moleküllion-Peak bei m/z 270 und weitere charakteristische Peaks bei m/z 152 und m/z 118. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) auftretende Dubletts bei δ 7,95 ppm (2H, $J = 8$ Hz, H-2', H-6') und 7,03 ppm

(2H, $J = 8$ Hz, H-3', H-5') zeigten ein aromatisches AA'BB'-System an. Zwei weitere Dubletts bei δ 6,54 ppm (1H, $J = 2$ Hz, H-6 oder H-8) und 6,26 ppm (1H, $J = 2$ Hz, H-8 oder H-6) wiesen auf einen 1,2,3,5-tetrasubstituierten Aromaten hin. Ein Singulett bei δ 13,02 ppm (1H) konnte einer Hydroxygruppe an Position 5 eines Flavonderivates (Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-C-Atom) zugeordnet werden. Die beiden MS-Fragmente bei m/z 152 und m/z 118 führten zu der Schlussfolgerung, dass **9** dem 4',5,7-Trihydroxyflavon [Apigenin] entsprach. Dies konnte durch Vergleich mit den spektroskopischen Daten von synthetischem Apigenin[®] (MERCK) bestätigt werden. Auch aus der biologisch aktiven Fraktion 10 des lipophilen Rohextraktes wurde Apigenin gewonnen. Die Aufarbeitung von Fraktion 5 des aktiven methanolischen Rohextrakts von *C. tenuifolia* führte ebenfalls zur Isolierung von **9** (siehe Kap. 5.8.).

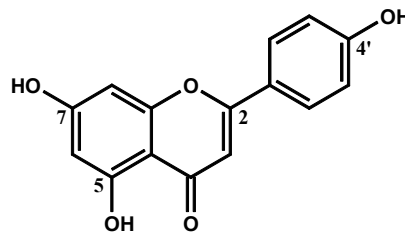


Abb. 38: Strukturformel von 4',5,7-Trihydroxyflavon [Apigenin] (9)

2.4.1.3 Isolierung und Strukturaufklärung von 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (10)

Weiterhin konnte aus Fraktion 9 mittels präparativer HPLC die Verbindung **10** isoliert werden. Das EI-Massenspektrum zeigte einen Moleküllion-Peak bei m/z 284 und weitere charakteristische Peaks bei m/z 166 und m/z 118 (siehe Kap. 5.9.3.). Im ¹H-NMR-Spektrum (Aceton-D₆) war das Kopplungsmuster der Signale im aromatischen Bereich dem von **9** sehr ähnlich und deutete daraufhin, dass **10** ebenfalls einem 4',5,7-trisubstituierten Flavon entsprach. Ein Singulett bei δ 12,99 ppm (1H) wies auf eine Hydroxygruppe in Position 5 hin. Ein weiteres Singulett bei δ 3,93 ppm (3H) zeigte die Anwesenheit einer Methoxygruppe an. Weiterhin führten die charakteristischen MS-Fragmente zu der Annahme, dass **10** dem 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] entsprach. Durch Vergleich mit Literaturdaten konnte dies bestätigt werden (Brieskorn *et al.*, 1968). Genkwanin wurde zuvor u.a. aus *Daphne genkwa* SIEBOLD & ZUCC. (Thymelaeaceae) isoliert (Harborne, 1967). In Fraktion 11 des wässrigen Auszuges von *C.*

tenuifolia konnte mittels ^1H -NMR- und MS-Spektren ebenfalls Verbindung **10** detektiert werden.

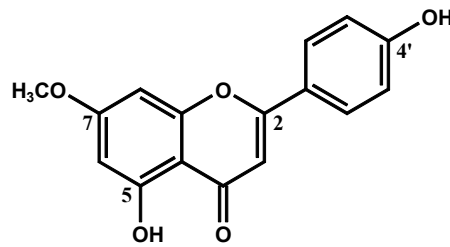
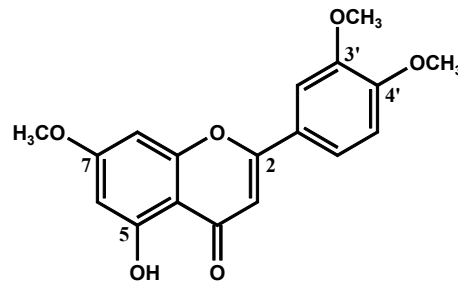


Abb. 39: Strukturformel von 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (10)

2.4.1.4 Isolierung und Strukturaufklärung von 5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavon [Luteolin-3',4',7-trimethylether] (11)

Die Aufarbeitung von Fraktion 11 (IC_{50} -Wert: 4,8 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) des lipophilen Rohextraktes mittels präparativer HPLC und anschließender präparativer DC führte zur Isolierung der Verbindung **11**. Zur Strukturaufklärung wurden EI-Massenspektren und ^1H -NMR-Spektren herangezogen (siehe Kap. 5.9.4.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 328 und weitere Peaks bei m/z 167 und m/z 162. Im ^1H -NMR-Spektrum (Aceton- D_6) war das Kopplungsmuster der Signale im aromatischen Bereich dem von **8** sehr ähnlich. Dies deutete daraufhin, dass es sich bei **11** ebenfalls um ein 3',4',5,7-tetrasubstituiertes Flavon handelte. Ein Singulett bei δ 12,97 ppm (1H) zeigte eine Hydroxygruppe in Position 5 an, zwei weitere Singuletts bei δ 3,96 ppm (3H) und 3,93 ppm (6H) wiesen auf drei Methoxygruppen hin. Mittels der charakteristischen MS-Fragmente bei m/z 167 und m/z 162 konnten die Positionen der Methoxygruppen bestätigt werden. Ein Vergleich mit Literaturangaben bestätigte, dass **11** dem 5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavon [Luteolin-3',4',7-trimethylether] entsprach, welches zuvor u.a. aus *Striga asiatica* (L.) O. KUNTZE (Scrophulariaceae) isoliert wurde (Nakanishi *et al.*, 1985).



**Abb. 40: Strukturformel von 5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavon
[Luteolin-3',4',7-trimethylether] (11)**

2.4.1.5 Isolierung und Strukturaufklärung von 5-Hydroxy-4',7-dimethoxyflavon [7-Methylacacetin] (12)

Aus der aktiven Fraktion 12 (IC_{50} -Wert: 9,9 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) des lipophilen Rohextraktes von *C. tenuifolia* wurde mittels präparativer HPLC die Verbindung **12** isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels EI-Massenspektren und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (siehe Kap. 5.9.5.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 298 und weitere Peaks bei m/z 165 und m/z 133. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) war das Kopplungsmuster der Signale im aromatischen Bereich dem von Verbindung **10** sehr ähnlich. Dies ließ vermuten, dass es sich bei **12** ebenfalls um ein 4',5,7-trisubstituiertes Flavon handelte. Ein Singulett bei δ 12,96 ppm (1H) zeigte eine Hydroxygruppe in Position 5 an, zwei weitere Singulets bei δ 3,94 ppm (3H) und 3,93 ppm (3H) deuteten auf zwei Methoxygruppen hin. Die Positionen der Methoxygruppen konnten durch die MS-Fragmente bei m/z 165 und m/z 133 bestätigt werden. Ein Vergleich mit veröffentlichten spektroskopischen Daten bestätigte, dass **12** dem Naturstoff 5-Hydroxy-4',7-dimethoxyflavon [7-Methylacacetin] entsprach, welcher zuvor u.a. aus *Baccharis rhomboidalis* REMY (Asteraceae) isoliert wurde (Silva *et al.*, 1971).

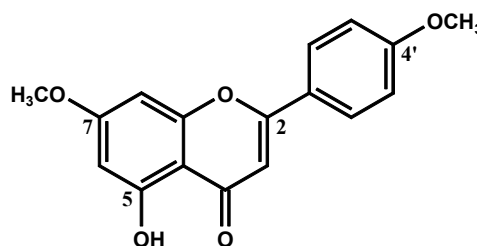


Abb. 41: Strukturformel von 5-Hydroxy-4',7-dimethoxyflavon [7-Methylacacetin] (12)

2.4.1.6 Isolierung und Strukturaufklärung von Octadeca-9Z,12Z,15Z-triensäure [α -Linolensäure] (13)

Weiterhin konnte aus Fraktion 12 des lipophilen Rohextraktes der untersuchten Blattdroge ein biologisch aktives Dreikomponentengemisch gewonnen werden. Aus diesem konnte mittels präparativer DC (Mehrfachentwicklung, siehe Kap. 5.5.1.) die Verbindung **13** isoliert werden. Zur Strukturaufklärung wurden EI-Massenspektren und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren herangezogen (siehe Kap. 5.9.6.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 278 und einen charakteristischen Peak bei m/z 149. Im $^1\text{H-NMR}$ (MeOD) auftretende Signale bei δ 0,97 ppm (3H, *t*, $J = 8$ Hz, H-18) und bei δ 1,35 ppm (8H, *m*, H-4, H-5, H-6, H-7) deuteten auf eine unverzweigte Alkylkette hin. Ein Multiplett im Bereich δ 5,39–5,28 ppm (6H, *m*, H-9, H-10, H-12, H-13, H-15, H-16) zeigte die Anwesenheit von Doppelbindungen an. Das Signal bei δ 2,81 ppm (4H, *t*, $J = 6$ Hz, H-11, H-14) ist charakteristisch für Methylengruppen, die zwischen zwei Doppelbindungen liegen. Aus dem Verhältnis der Peakintegrale (6:4) beider Signale konnte geschlossen werden, dass im Molekül drei Doppelbindungen vorliegen. Zusätzlich wies ein EI-MS-Fragment bei m/z 149 auf eine Allylsplaltung hin, welche häufig bei ungesättigten Fettsäuren zu beobachten ist. Ein Vergleich mit veröffentlichten spektroskopischen Daten bestätigte die Annahme, dass **13** dem Naturstoff Octadeca-9Z,12Z,15Z-triensäure [α -Linolensäure] entsprach (Bhacca, 1963).

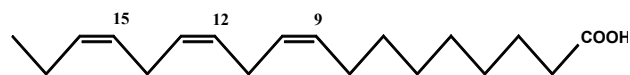
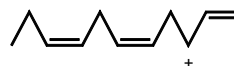


Abb. 42: Strukturformel von Octadeca-9Z,12Z,15Z-triensäure [α -Linolensäure] (13), $m/z = 278$



$m/z = 149$

Abb. 43: Charakteristisches MS-Fragment von 13 nach der Allylsplaltung

2.4.1.7 Isolierung und Strukturaufklärung von Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (14)

Aus dem Dreikomponentengemisch, das aus Fraktion 12 des lipophilen Rohextraktes hervorging, konnte ebenfalls mittels präparativer DC (Mehrfachentwicklung) die Verbindung **14** isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe von EI-Massenspektren und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (siehe Kap. 5.9.7.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 280 und zwei weitere Peaks bei m/z 223 und m/z 151. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (MeOD) zeigte große Ähnlichkeiten mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **13** und ließ vermuten, dass **14** ebenfalls einer unverzweigten, ungesättigten, aliphatischen Verbindung entsprach. Das Verhältnis der Peakintegrale der Signale im Bereich δ 5,38–5,31 ppm (4H, *m*, H-9, H-10, H-12, H-13) und bei δ 2,76 ppm (2H, *t*, $J = 7$, H-11) wies auf zwei Doppelbindungen im Molekül hin. Die EI-MS-Fragmente bei m/z 223 und m/z 151 kennzeichneten zusätzlich eine Allylsplattung. Durch Vergleich mit Literaturdaten konnte gezeigt werden, dass **14** der Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] entsprach (Gunstone, 1995).

Verbindung **14** konnte weiterhin in den Fraktionen 8F bzw. 10C, die aus dem Rohextrakt der oberirdischen Pflanzenteile von *Microglossa pyrifolia* (Ernte 2000 bzw. Ernte 2001) gewonnen wurden, mittels $^1\text{H-NMR}$ -Messung detektiert werden (siehe Kap.5.10.1. bzw. 5.10.3.).

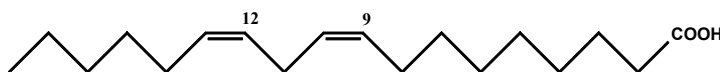


Abb. 44: Strukturformel von Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (14), $m/z = 280$



Abb. 45: Charakteristische MS-Fragmente von **14** nach der Allylsplattung

2.4.2 Ermittlung der antiplasmodialen Aktivität gegenüber *P. falciparum*

Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität der Rohextrakte

Analog zu der in Kap. 2.3.2. beschriebenen Methode, wurde von allen Rohextrakten der Blätter von *C. tenuifolia* die *in-vitro*-Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum* (Dd2 und PoW) getestet.

Tab. 9:

Antiplasmodiale *in-vitro*-Aktivität der Rohextrakte von *Calea tenuifolia* gegenüber *Plasmodium falciparum*

Rohextrakte der Blätter von <i>C. tenuifolia</i>	IC ₅₀ -Werte (µg/ml) ^a nach 42 h		IC ₅₀ -Werte (µg/ml) nach 72 h	
	PoW	Dd2	PoW	Dd2
Lipophiler Extrakt (PE-EtOAc 1:1)	10,4	24,3	15,2	10,2
Methanolischer Extrakt (MeOH 100 %)	19,7	19,5	> 50	> 50
Wässriger Auszug	> 50	> 50	n.b.	n.b.
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	0,008	0,073	0,004	0,02

^a: getestet als Triplikat

n.b.: nicht bestimmt

Wie aus den Ergebnissen der Tabelle 9 ersichtlich, konnte für die Blattdroge von *C. tenuifolia* die antiplasmodiale Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden. Hierbei ist auffällig, dass sich nach einer Testdauer von 72 Stunden die Aktivität des lipophilen Rohextraktes von einem IC₅₀-Wert von 24,3 µg/ml (Dd2, nach 42 h) auf einen IC₅₀-Wert von 10,2 µg/ml (Dd2, nach 72 h) verringerte. Diese deutlichen Unterschiede in den IC₅₀-Werten sind jedoch gegenüber dem Chloroquin-sensiblen Stamm PoW nicht festzustellen (IC₅₀-Wert: 10,4 µg/ml nach 42 h, IC₅₀-Wert: 10,2 µg/ml nach 72 h). Da die drei ermittelten IC₅₀-Werte des lipophilen Rohextraktes bei 15,2 µg/ml, 10,4 µg/ml und 10,2 µg/ml lagen, ist zu vermuten, dass der erhöhte IC₅₀-Wert von 24,3 µg/ml [Dd2] auf biologische Schwankungen im *in-vitro*-Testsystem zurückzuführen ist. Ein Beispiel für biologische Schwankungen wären unterschiedliche Wachstumsraten der Plasmodien des Chloroquin-resistenten Klons Dd2 auf verschiedenen 96-Loch-Mikrotiterplatten. Der methanolische Rohextrakt zeigte nach 42 Stunden eine Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten mit IC₅₀-

Werten von 19,7 µg/ml [PoW] und 19,5 µg/ml [Dd2]. Eine Testverlängerung machte sich hier jedoch negativ bemerkbar: nach 72stündiger Testdauer erwies sich der Rohextrakt als nicht antiplasmodial aktiv. Eine Erklärung hierfür könnten Instabilitäten der enthaltenen Verbindungen im wässrigen Lösemittel sein.

Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität der isolierten Verbindungen

In Tabelle 10 ist die antiplasmodiale *in-vitro*-Hemmwirkung der aus *C. tenuifolia* isolierten Naturstoffe gegenüber dem Stamm PoW und dem Klon Dd2 widergegeben.

Tab. 10:

In-vitro*-Aktivität der isolierten Verbindungen aus *Calea tenuifolia* gegenüber *Plasmodium falciparum

Isolierte Verbindungen aus <i>C. tenuifolia</i>	IC ₅₀ -Werte ^a			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
5,7– Dihydroxy–3',4'– dimethoxyflavon (8)	13,6	43,3	10,5	33,4
4',5,7– Trihydroxyflavon (9)	14,6	54,0	25,0	92,5
4',5–Dihydroxy–7–methoxyflavon (10)	5,4	19,0	8,1	28,5
5–Hydroxy–3',4',7–trimethoxyflavon (11)	5,9	18,0	n.b.	n.b.
5–Hydroxy–4',7–dimethoxyflavon (12)	6,0	20,1	5,1	17,1
Octadeca–9Z,12Z,15Z–triensäure (13)	13,8	49,6	39,5	142,1
Octadeca–9Z,12Z–diensäure (14)	6,1	21,8	8,7	31,1
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	0,008	0,015	0,073	0,14

n.b.: nicht bestimmt

^a: getestet als Triplikat

Aus den Daten der Tabelle 10 ist zu entnehmen, dass alle aus den Blättern von *C. tenuifolia* isolierten Verbindungen eine *in-vitro*-Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* zeigten. Hierbei wies 5–Hydroxy–4',7–dimethoxyflavon [7–Methylacacetin] (**12**) die höchste Aktivität mit IC₅₀-Werten von 20,1 µM [PoW] und 17,1 µM [Dd2] auf. Die Flavone 5,7–Dihydroxy–3',4'– dimethoxyflavon [Luteolin–3',4'–dimethylether] (**8**), 4',5–Dihydroxy–7–methoxyflavon [Genkwanin] (**10**) und 5–Hydroxy–3',4',7–trimethoxyflavon [Luteolin–3',4',7–trimethylether] (**11**) zeigten eine gute bis moderate Wirkung mit IC₅₀-

Werte zwischen 18,0 μM und 43,3 μM (jeweils gegenüber PoW). Die Verbindung mit der höchsten Polarität, 4',5,7-Trihydroxyflavon [Apigenin] (**9**) besaß die geringste Hemmwirkung mit IC_{50} -Werten von 54,0 μM gegenüber PoW und 92,5 μM gegenüber Dd2.

Die *in-vitro*-Wirkung von Flavonoiden gegenüber *P. falciparum* wurde bereits in früheren Untersuchungen beschrieben (Khalid *et al.*, 1986). Dabei erwies sich in dieser Studie das 3',4',5,7-Tetrahydroxyflavonol [Quercetin] als antiplasmodial aktiv (IC_{50} -Wert: 21,2 μM gegenüber dem Chloroquin-resistenten Stamm FCR_{3TC}), jedoch nicht die entsprechende glykosidische Verbindung Quercetin-3-O-(6-O-rhamnosyl)-glukosid [Rutin]. In einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Quercetin antimitochondriale Wirkungen gegenüber *P. falciparum* aufweist (Divo *et al.*, 1985).

Bei der im Laufe der vorliegenden Untersuchung an *C. tenuifolia* isolierten Verbindung 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (**10**) wurde beobachtet, dass die *in-vitro*-Wirkung von **10** in Abhängigkeit zum Entwicklungsstadium des Parasiten steht. Genkwanin (**10**), zeigte eine stärkere Hemmwirkung (IC_{50} -Werte: 19,0 μM [PoW], 28,5 μM [Dd2]), wenn sich zu Beginn des Tests eine hohe Anzahl von Schizonten in der Kultur von *P. falciparum* befanden. Wurde zu Testbeginn eine hohe Anzahl von Ringstadien in der Parasitenkultur beobachtet, führte dies zu einer geringeren Hemmwirkung von **10** (IC_{50} -Werte: 78,5 μM [PoW], 81,3 μM [Dd2]).

In zahlreichen früheren Studien wurde festgestellt, dass bestimmte Flavonoide (z.B. Rutin) in der Lage sind, die Blutkapillarpermeabilität herabzusetzen. Aus diesem Grund werden z.B. Rutinpräparate in der Venentherapie eingesetzt (Teuschner, 1997).

Möglicherweise ist der bei **10** beobachtete Effekt auf den Einfluß der Flavone auf die Membrandurchlässigkeit der Erythrozyten zurückzuführen. Demnach würden nach der Ruptur der Schizonten die freigesetzten Merozoiten schlechter die Erythrozytenmembran passieren können. Dies würde zu einer geringen Anzahl von neuinfizierten Erythrozyten (= Herabsetzung der Parasitämie) führen, und somit zu geringeren IC_{50} -Werten der getesteten Verbindung. Aufgrund der geringen Substanzmenge von **10**, war es nicht möglich, diese Vermutung durch einen Testansatz mit synchronisierten Kulturen von *P. falciparum* zu bestätigen.

Da Flavone im menschlichen Körper stark verstoffwechselt werden, muß berücksichtigt werden, dass auch die Metaboliten der Flavone einen Einfluß auf die antiplasmodiale *in-vivo*-Hemmwirkung besitzen können. Für Apigenin wurden die Metaboliten 4-

Hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxyphenylpropionsäure und 4-Hydroxyzimtsäure gefunden (Griffiths *et al.*, 1972). Basierend auf diesen Daten, wurde im Rahmen unserer Arbeit an *C. tenuifolia* synthetische 4-Hydroxyzimtsäure[®] (MERCK), welche allerdings gegenüber *P. falciparum* keine Hemmwirkung aufwies.

Aus *C. tenuifolia* wurden weiterhin die beiden Fettsäuren Octadeca-9Z,12Z,15Z-triensäure [α -Linolensäure] (**13**) und Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (**14**) isoliert mit IC₅₀-Werten zwischen 21,8 μ M [PoW] und 142,1 μ M [Dd2]. Beachtenswert ist, dass Linolsäure (zweifach ungesättigt) eine wesentlich höhere Hemmwirkung als α -Linolensäure (dreifach ungesättigt) zeigte. Die antiplasmodiale Wirkung von ungesättigten Fettsäuren wurde bereits beschrieben: Krugliak und Mitarbeiter (1995) beobachteten u.a. für Linolsäure und α -Linolensäure eine *in-vitro*-Hemmung gegenüber *P. falciparum* sowie eine *in-vivo*-Hemmung gegenüber *P. berghei*. Ergebnisse einer weiteren Studie zeigten, dass sich die antiplasmodiale Aktivität von Fettsäuren bei zunehmender Anzahl von Doppelbindungen im Molekül erhöhte (Kumaratilake *et al.*, 1992). Es wird vermutet, dass die Umsetzung der ungesättigten Fettsäuren durch eine Pseudo-Lipoxygenase-Wirkung des Hämoglobins katalysiert wird. Dabei entstehen radikalisch wirkende Metabolite, die insbesondere auf die parasitären Ringstadien einwirken und dadurch die Parasitenentwicklung blockieren. Die Metabolite verursachen intraerythrozytäre degenerative Parasitenformen, die absterben (Umlawski, 1998).

Mit den im vorliegenden Testsystem ermittelten Hemmwirkungen für Linolsäure (**14**) (IC₅₀-Werte: 21,8 μ M [PoW], 31,1 μ M [Dd2]) und α -Linolensäure (**13**) (IC₅₀-Werte: 49,6 μ M [PoW], 142,1 μ M [Dd2]) konnten diese Beobachtungen von Kumaratilake und Mitarbeitern jedoch nicht bestätigt werden.

Im Laufe der phytochemischen Aufarbeitung des lipophilen und methanolischen Rohextraktes der Blattdroge von *C. tenuifolia* wurden aus allen aktiven Fraktionen (IC₅₀-Wert: < 25 μ g/ml) Flavone mit einer Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten isoliert. Aus diesem Grund vermuten wir, dass diese Naturstoffe das antiplasmodiale Wirkprinzip der untersuchten Droge von *C. tenuifolia* darstellen.

Antiplasmodiale Wirkung des wässrigen Auszuges

Um die antiplasmodiale Hemmwirkung der traditionellen Zubereitung der Blattdroge von *C. tenuifolia* bestätigen zu können, wurde aus den Blättern ein wässriger Auszug hergestellt. Eine Probe des Rückstandes wurde dem antiplasmodialen Test zugeführt und erwies sich als nicht aktiv. Anschließend wurde die gesamte Probenmenge über eine RP-

18-Säule aufgetrennt und mittels eines MeOH-H₂O-Gradienten abnehmender Polarität, MeOH und CHCl₃ fraktioniert (siehe Kap. 5.8.). Das Eluat wurde in mehreren Fraktionen aufgefangen, die alle auf ihre antiplasmodiale Wirkung getestet wurden. Die folgenden Fraktionen wiesen eine sehr schwache Hemmwirkung auf:

Fraktion 10: IC₅₀-Wert: 83,7 µg/ml [Dd2] und

Fraktion 11: IC₅₀-Wert: 41,5 µg/ml [Dd2].

Mittels ¹H-NMR- und MS-Spektren konnte in Fraktion 10 die Verbindung 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] (**8**) detektiert werden. In Fraktion 11 wurde durch ¹H-NMR-Messung und Aufnahme des MS-Spektrums der Naturstoff 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (**10**) nachgewiesen. Wie zuvor bereits festgestellt, wiesen beide Naturstoffe mit IC₅₀-Werten zwischen 19,0 µM und 43,3 µM [PoW] eine moderate Aktivität auf. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Fraktionierung des antiplasmodial unwirksamen wässrigen Auszuges zu einer Anreicherung der biologischen Aktivität in einzelnen Fraktionen führte. Auch in der traditionellen Zubereitungsform der Blattdroge, dem wässrigen Auszug, sind in geringen Konzentrationen antiplasmodial wirksame Inhaltsstoffe enthalten. Somit konnte die *in-vitro*-antiplasmodiale Wirkung der Blätter von *C. tenuifolia* bestätigt werden. Die Gesamtheit unserer Ergebnisse deutet daraufhin, dass die Verwendung der Blattdroge in der phytotherapeutischen Malariatherapie Zentralamerikas auf eine rationale Basis gestellt werden kann.

2.4.3 Antiplasmodiale Wirkung von Flavon-Fettsäure-Gemischen

Um Hinweise auf den antiparasitären Mechanismus der isolierten Inhaltsstoffe zu erhalten, wurden mit einigen Verbindungen weiterführende Untersuchungen durchgeführt.

Verschiedene antiplasmodial aktive Fraktionen von *C. tenuifolia*, aus denen die Flavone **8**–**12** isoliert wurden, enthielten zusätzlich Fettsäuren. Dies war anhand charakteristischer Signale im ¹H-NMR-Spektrum der entsprechenden Fraktionen zu erkennen. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwiefern Flavon-Fettsäure-Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung einen synergistischen Effekt besitzen und dadurch Einfluß auf die antiplasmodiale Aktivität ausüben. Als Testsubstanzen wurden die Flavone Apigenin[®] (MERCK) und 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (**10**) und die Fettsäure Palmitinsäure[®] (MERCK) verwendet.

Tab. 11:

**Antiplasmodiale *in-vitro*-Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum*
von Flavon-Fettsäure-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung**

Getestete Verbindungen	Verhältnis (m/m)	IC ₅₀ -Werte (µg/ml) ^a	
Apigenin		11,3	[PoW]
Palmitinsäure		23,4	[PoW]
Apigenin : Palmitinsäure	2 : 1	10,5	[PoW]
	1 : 1	17,6	[PoW]
	1 : 2	9,6	[PoW]
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄		0,008	[PoW]
Genkwanin		23,1	[Dd2]
Palmitinsäure		27,8	[Dd2]
Genkwanin : Palmitinsäure	2 : 1	21,4	[Dd2]
	1 : 1	28,5	[Dd2]
	1 : 2	26,0	[Dd2]
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄		0,073	[Dd2]

^a: getestet als Triplikate

Zu Testbeginn lagen eine hohe Anzahl von Ringstadien in der Plasmodienkultur vor. Dies ist eine mögliche Erklärung für die geringe Hemmwirkung von Genkwanin **10**, verglichen mit dem ermittelten IC₅₀-Wert in Tabelle 10 (siehe auch die Erläuterungen bzgl. der für **10** beobachteten Schwankungen der IC₅₀-Werte).

Die Ergebnisse in Tabelle 11 zeigten, dass bei verschiedenen Zusammensetzungen der getesteten Flavone und der Fettsäure kein Synergismus bzgl. der Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten festzustellen war. Im Fall der untersuchten Apigenin-Palmitinsäure-Gemische waren die IC₅₀-Werte im Bereich 9,6 µg/ml bis 17,6 µg/ml, denen von Apigenin (IC₅₀-Werte: 11,3 µg/ml) und Palmitinsäure (IC₅₀-Werte: 23,4 µg/ml) sehr ähnlich. Bei den getesteten Genkwanin-Palmitinsäure-Gemischen wurden die selben Beobachtungen gemacht. Die IC₅₀-Werte der Gemische im Bereich von 21,4 µg/ml bis 28,5 µg/ml, unterschieden sich kaum von den IC₅₀-Werten Genkwanins (IC₅₀-Werte: 23,1 µg/ml) und Palmitinsäure (IC₅₀-Werte: 27,8 µg/ml).

2.4.4 Zytotoxische Wirkung der isolierten Verbindungen

Von den aus *C. tenuifolia* isolierten Flavonen (**8–12**) und Linolsäure (**14**) wurde die zytotoxische Wirkung an der humanen Endothelzelllinie ECV 304 untersucht. Es sollte ermittelt werden, ob die *in-vitro*-Aktivität der isolierten Verbindungen auf eine Hemmung von *P. falciparum* oder auf eine allgemeine Zelltoxizität zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde der Selektivitätsindex (SI) errechnet.

Tab. 12:

Zytotoxische Wirkung von isolierten Verbindungen aus *Calea tenuifolia* gegenüber der Zelllinie ECV 304

Isolierte Verbindungen aus <i>C. tenuifolia</i>	IC ₅₀ -Werte (µM) ^a		SI ^b
	ECV 304	Dd2	
5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon (8)	435,9	33,4	13,1
4',5,7-Trihydroxyflavon (9)	82,1	92,5	0,9
4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon (10)	106,2	28,5	3,7
5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavon (11)	48,1	18,0 [#]	2,7
5-Hydroxy-4',7-dimethoxyflavon (12)	26,8	17,1	1,6
Octadeca-9Z,12Z-diensäure (14)	27,1	31,1	0,9
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	57,5	0,14	411,0

^a: Zahl der Experimente: 8 (ECV 304), 3 [Dd2]

^b: Selektivitätsindex (SI) ist definiert als Quotient aus der zytotoxischen über der antiplasmodialen Aktivität

[#]: PoW

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, erwies sich 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] (**8**) als nicht zytotoxisch mit einem IC₅₀-Wert von 435,9 µM gegenüber der humanen Endothelzelllinie ECV 304. Die antiplasmodiale Aktivität gegenüber Dd2 war um das dreizehnfache höher (IC₅₀-Wert: 33,4 µM). Ein moderater zytotoxischer Effekt war bei 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] **10** zu beobachten (IC₅₀-Wert: 28,5 µM). Gegenüber *P. falciparum* wurde eine vierfach höhere Hemmwirkung beobachtet (IC₅₀-Wert: 28,5 µM). Die beiden Verbindungen 4',5,7-Trihydroxyflavon [Apigenin] (**9**) und 5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavon [Luteolin-3',4',7-trimethylether] (**11**) besaßen ebenfalls eine moderate Zytoxizität gegenüber der Zelllinie ECV 304 mit IC₅₀-Werten von 82,1 µM für **9** und 48,1 µM für **11**. Bei Luteolin-

3',4',7-trimethylether (**11**) war die antiplasmodiale Wirkung mit einem IC_{50} -Wert von $18,0 \mu\text{M}$ [PoW] um das dreifache höher als die zytotoxische Aktivität. Apigenin (**9**) wies im Vergleich zum zytotoxischen Effekt, eine schwächere Hemmwirkung (IC_{50} -Wert: $92,5 \mu\text{M}$ [Dd2]) gegenüber dem Parasiten auf. 7-Methylacacetin (**12**) zeigte einen starken zytotoxischen Effekt (IC_{50} -Wert: $26,8 \mu\text{M}$). Die antiplasmodiale Wirkung von **12** war geringfügig höher (IC_{50} -Wert: $17,1 \mu\text{M}$ [Dd2]). Linolsäure (**14**) erwies sich ebenfalls als stark zytotoxisch gegenüber der getesteten Zelllinie (IC_{50} -Wert: $27,1 \mu\text{M}$). Die antiparasitäre Hemmwirkung der Fettsäure war im Vergleich dazu geringfügig schwächer (IC_{50} -Wert: $31,3 \mu\text{M}$ [Dd2]).

Nochmals zu erwähnen wäre hierbei, dass die Flavone Luteolin-3',4'-dimethylether (**8**) und Genkwanin (**10**) auch in einem wässrigen Auszug, entsprechend der traditionellen Zubereitungsform der Droge, nachgewiesen werden konnten.

Um eine genauere Aussage bzgl. der Zytotoxizität der getesteten Verbindungen machen zu können, müssten die Daten von mehreren Zelllinien berücksichtigt werden. So ist beispielsweise die im vorliegenden Testsystem zytotoxisch wirkende Fettsäure Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (**14**) in vielen Nahrungsmitteln enthalten, deren täglicher Verzehr als unbedenklich gilt. Weiterhin sind die isolierten Flavone im Pflanzenreich weit verbreitet. Zu nennen wäre hier z.B. Apigenin, das in bestimmten Gemüsesorten wie Sellerie (*Apium graveolens* L., Apiaceae) angereichert ist (Metz, 2000). Der Verzehr solcher Nahrungsmittel gilt im allgemeinen als unbedenklich.

Hieraus wird geschlussfolgert werden, dass auf der Grundlage dieses einen *in-vitro*-Tests (keine *in-vivo*-Daten!) die Relevanz von *C. tenuifolia* als traditionelle Heilpflanze in der Malariatherapie nicht vollständig bewertet werden kann. Die im Laufe der vorliegenden Studie erhaltenen Ergebnisse in den *in-vitro*-Testsystemen deuten jedoch daraufhin, dass eine uneingeschränkte bzw. langfristige Anwendung von *C. tenuifolia* nicht zu empfehlen ist.

2.5 *Microglossa pyrifolia* (LAM.) KUNTZE

2.5.1 Phytochemische Untersuchungen der antiplasmodial aktiven lipophilen Rohextrakte von *Microglossa pyrifolia* (Ernte 2000)

Phytochemische Untersuchung des Rohextraktes aus den oberirdischen Pflanzenteilen

Aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *M. pyrifolia* wurde durch Kaltextraktion ein lipophiler Rohextrakt (PE–EtOAc 1:1) gewonnen, der aufgrund seiner antiplasmodialen Aktivität (IC₅₀–Wert: 10,5 µg/ml [PoW], 13,1 µg/ml [Dd2]) an einer RP–18–Säule aufgetrennt wurde. Die erhaltenen Fraktionen 6–8 erwiesen sich als biologisch aktiv und wurden weiter aufgearbeitet (siehe Kap. 5.10.1.). Bei der Aufarbeitung von Fraktion 8 konnte durch ¹H–NMR–Messung festgestellt werden, dass in der erhaltenen Fraktion 8F Octadeca–9Z,12Z–diensäure [Linolsäure] (**14**) angereichert war. Da diese Verbindung im Rahmen der phytochemischen Untersuchungen von *C. tenuifolia* bereits isoliert und charakterisiert wurde (siehe Kap. 2.4.1.7.), erfolgte hier keine weitere Isolierung von **14**.

2.5.1.1 Isolierung und Strukturaufklärung von 7–Hydroxycumarin [Umbelliferon] (**15**)

Aus der aktiven Fraktion 6 (IC₅₀–Wert: 4,3 µg/ml [Dd2]) des lipophilen Rohextraktes der oberirdischen Pflanzenteile wurde mittels präparativer DC die Verbindung **15** isoliert. Die Aufklärung der Molekülstruktur erfolgte durch EI–Massenspektren und ¹H–NMR–Spektren (siehe Kap. 5.11.1.). Im EI–Massenspektrum war ein Molekülion–Peak bei *m/z* 162 erkennbar. Ein weiterer Peak bei *m/z* 134 wies auf die Abspaltung einer Carbonyleinheit hin. Die im ¹H–NMR–Spektrum (Aceton–D₆) erkennbaren Signale bei δ 7,57 ppm (1H, *d*, *J* = 8 Hz, H–5), 6,91 ppm (1H, *dd*, *J* = 2 Hz, 8 Hz, H–6) und 6,88 ppm (1H, *d*, *J* = 2 Hz, H–8) zeigten ein 1,2,4–trisubstituiertes aromatisches System an. Dubletts bei δ 7,89 ppm (1H, H–4) und 6,20 ppm (1H, H–3) mit einer Kopplungskonstante von jeweils *J* = 9 Hz deuteten auf zwei olefinische, *cis*–ständige Protonen hin. Anhand der Spektraldaten wurde für **15** die Struktur des 7–Hydroxycumarins [Umbelliferon] postuliert. Dies konnte durch Vergleich mit den spektroskopischen Daten von synthetischem Umbelliferon[®] (MERCK) bestätigt werden.

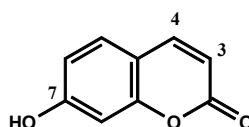
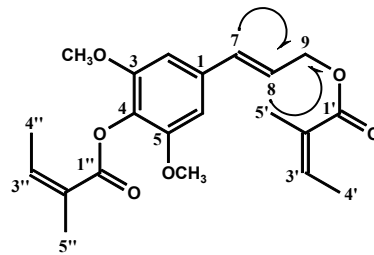


Abb. 46: Strukturaufklärung von 7-Hydroxycoumarin [Umbelliferon] (15)

2.5.1.2 Isolierung und Strukturaufklärung von Sinapyldiangelat (16)

Die antiplasmodial wirkende Fraktion 7 (IC_{50} -Wert: 5,9 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) wurde über eine Kieselsäule aufgereinigt. Aus Fraktion 7A konnte mittels semipräparativer HPLC die Verbindung **16** isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte durch EI-Massenspektren, HR-MS-Messungen sowie $^1\text{H-NMR}$ - und $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -Spektren (siehe Kap. 5.11.2.). Im EI-Massenspektrum war ein Molekülion-Peak bei m/z 374 und ein charakteristisches Fragment bei m/z 292 erkennbar. Die HR-MS-Messung ergab die Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_6$. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) auftretende Singulets bei δ 6,90 ppm (2H, H-2, H-6) und 3,84 ppm (6H, OCH_3 -3 und OCH_3 -5) zeigten einen 1,3,4,5-tetrasubstituierten Aromaten mit zwei Methoxygruppen an. Zusätzlich auftretende Signale bei δ 6,73 ppm (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H-7) und 6,47 ppm (1H, *td*, $J = 6$ Hz, 16 Hz, H-8) deuteten auf eine *trans*-konfigurierte Doppelbindung in Konjugation mit dem aromatischen System hin. Das $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -Spektrum zeigte ebenfalls Korrelationen zwischen den beiden Protonen bei δ 6,73 ppm und 6,47 ppm. Weiterhin waren Korrelationen zwischen dem Signal bei δ 6,47 ppm und einem weiteren Peak bei δ 4,81 ppm (2 H, *dd*, $J = 1$ Hz, 6 Hz, H-9) sichtbar, was auf eine allylische Methylengruppe hinwies. Die Tieffeldverschiebung dieser allylischen Methylengruppe ließ eine Veresterung in dieser Position vermuten. Weiterhin waren charakteristische Signale für zwei olefinische Protonen bei δ 6,23 ppm (1 H, *m*, H-3' oder H-3'') und 6,12 ppm (1H, *qq*, $J = 1$ Hz, 7 Hz, H-3'' oder H-3') sichtbar. Diese beiden olefinischen Protonensignale, zusammen mit den Signalen für drei Methylgruppen bei δ 2,20 ppm (3 H, *m*, CH_3 -4'' oder CH_3 -5''), 1,97 ppm (3H, *dq*, $J = 1$ Hz, 7 Hz, CH_3 -4') und 1,90 ppm (3 H, *quint*, $J = 1$ Hz, CH_3 -5') ließen die Anwesenheit zweier Angelatgruppen vermuten, wobei die vierte Methylgruppe vom Lösemittelpeak verdeckt sein mußte. Die Anwesenheit der Angelatgruppen wurde durch das charakteristische MS-Fragment bei m/z 292 bestätigt. Alle vorhandenen Spektraldaten führten zu der Annahme, dass es sich bei Verbindung **16** um Sinapyldiangelat handelte. Für die endgültige Strukturaufklärung konnten die

spektroskopischen Daten von Coniferyldiangelat (Bohlmann *et al.*, 1969), sowie zuvor isolierter Sinapylalkoholderivate (Bohlmann *et al.*, 1981b) herangezogen werden. Sinapyldiangelat ist ein neuer Naturstoff. Frühere Untersuchungen zeigten, dass Sinapylalkoholderivate sowie weitere Derivate substituierter Cinnamoylalkohole für die Biosynthese von Lignin von Bedeutung sind (Sanz *et al.*, 1990).



**Abb. 47: Strukturaufklärung von Sinapyldiangelat (16)
mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY-Korrelationen**

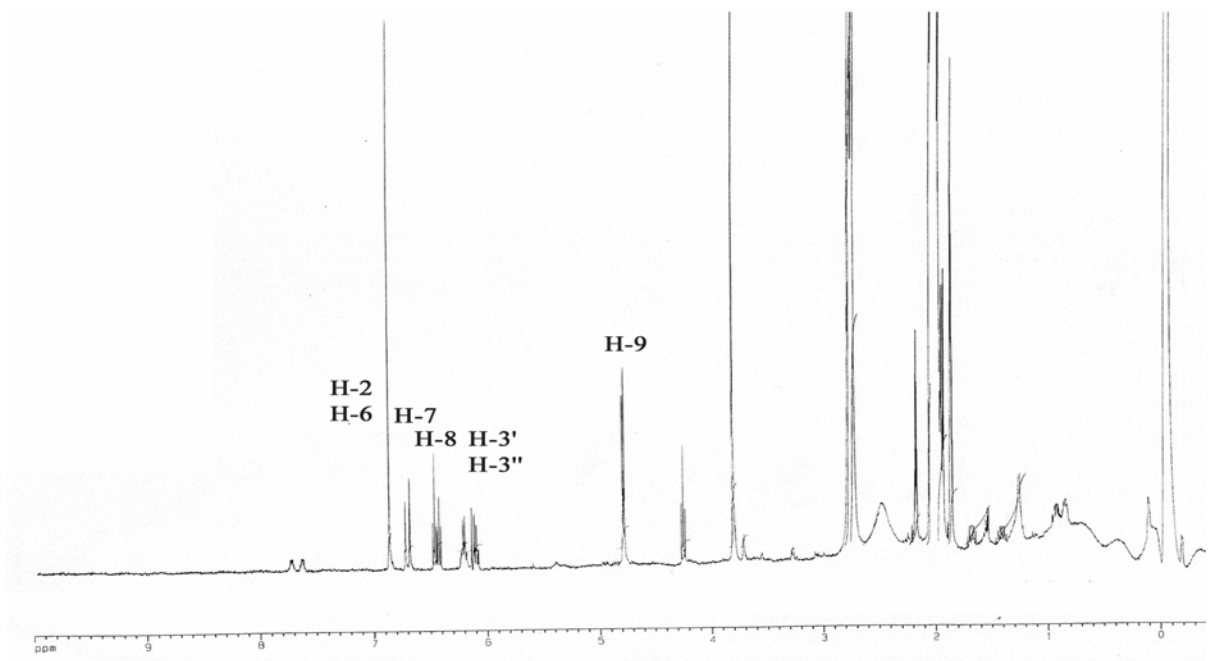


Abb. 48:

^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, Aceton- D_6) von Sinapyldiangelat (16)

2.5.1.3 Isolierung und Strukturaufklärung von **6E,10E,14E-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (17)**

Aus den nach der Auftrennung von Fraktion 7 erhaltenen Fraktionen 7C und 7D konnte durch präparative HPLC der Naturstoff **17** isoliert werden. Die Aufklärung der

Molekülstruktur erfolgte durch (–)-FAB-MS-Messungen und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (siehe Kap. 5.11.3.). Da das EI-Massenspektrum von **17** nicht geeignet war, um einen Molekülion-Peak zu bestimmen, konnte die Molmasse nur mittels der FAB-MS-Messung ermittelt werden. Das negative FAB-MS-Spektrum zeigte für $[\text{M-H}]^-$ ein Fragment bei m/z 319. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Molmasse der Verbindung m/z 320 entsprach. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) auftretende Signale bei δ 6,78 ppm (1H, t , $J = 7$ Hz, H-6), 5,42 ppm (1H, t , $J = 7$ Hz, H-2), 5,19 ppm (1H, t , $J = 7$ Hz, H-10) und 5,11 ppm (1H, t , $J = 7$ Hz, H-14) zeigten die Anwesenheit von vier Doppelbindungen an. Weitere Signale bei δ 2,39–2,32 ppm (4H, m , H-8, H-9) und 2,17–2,12 ppm (4H, m , H-4, H-5) deuteten auf Methylengruppen hin. Das Dublett bei δ 4,09 ppm (2H, d , $J = 7$ Hz, H-1) wies auf die Anwesenheit einer Hydroxymethylengruppe hin. Singulets bei δ 1,67 ppm (3H, H-20), 1,66 ppm (3H, H-18) und 1,59 ppm (6H, H-16, H-17) zeigten vier Methylgruppen an. Aufgrund dieser spektroskopischen Daten wurde vermutet, dass Verbindung **17** einen Geranylgeraniolgrundkörper besitzt. Für offenkettige Diterpene sind im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Signale für fünf Methylgruppen zu erwarten. Die Anzahl der im vorliegenden $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erkennbaren vier Methylgruppen sowie die Molmasse der Verbindung deuteten daraufhin, dass bei **17** eine Methylgruppe zur Carbonsäure oxidiert sein musste. Anhand der Spektraldaten konnte geschlussfolgert werden, dass es sich bei **17** um Geranylgeraniol-19-carbonsäure handelte. Ein Vergleich mit Literaturdaten zeigte, dass Verbindung **17** 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure entsprach, welche bereits zuvor aus *Microglossa pyrifolia* isoliert wurde (Zdero *et al.* 1990). Verbindung **17** war zusätzlich in den Fraktionen 8C–8E, welche nach der säulenchromatographischen Aufarbeitung von Fraktion 8 des lipophilen Rohextraktes von *M. pyrifolia* erhalten wurden (siehe Kap. 5.10.3.) enthalten.

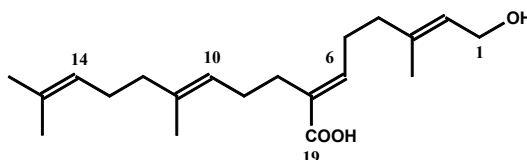


Abb. 49: Strukturaufklärung von 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (17**)**

2.5.1.4 Isolierung und Strukturaufklärung von 2E-Phytol (18)

Die aktive Fraktion 8 (IC₅₀-Wert: 5,9 µg/ml [Dd2]) wurde über eine Kieselgelsäule aufgearbeitet. Aus der erhaltenen Fraktion 8D wurde mittels präparativer DC der Naturstoff **18** isoliert. Zur Strukturaufklärung wurden EI-Massenspektren und ¹H-NMR-Spektren herangezogen (siehe Kap. 5.11.4.). Im EI-Massenspektrum war ein Molekülion-Peak bei *m/z* 296 erkennbar. Das ¹H-NMR-Spektrum (Aceton-D₆) zeigte ein Signal bei δ 5,43 ppm (1H, *dt*, *J* = 1 Hz, 7 Hz, H-2), welches auf ein olefinisches Proton einer trisubstituierten Doppelbindung hinwies. Ein auftretendes Dublett bei δ 4,15 ppm (2H, H-1) mit einer Kopplungskonstante von *J* = 7 Hz deutete auf eine allylische Hydroxymethylengruppe hin. Weitere Signale bei δ 1,52–1,10 ppm (19 H, *m*) wiesen auf Methylengruppen hin. Auftretende Signale bei δ 0,86 ppm (12H, *d*, *J* = 6 Hz, H-16, H-18, H-19, H-20) und 1,67 ppm (3H, *s*, H-17) zeigten fünf Methylgruppen an und ließen auf die Molekülstruktur eines offenkettigen Diterpens schließen. Aufgrund aller vorhandenen Spektraldaten wurde für **18** postuliert, dass es sich um 2E-Phytol handelte. Dies konnte durch Literaturdaten bestätigt werden (Pongprayoon *et al.*, 1992).

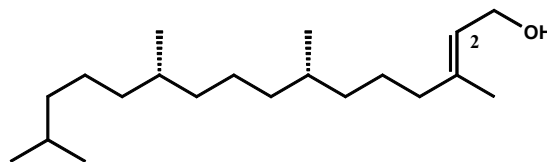


Abb. 50: Strukturaufklärung von 2E-Phytol (18)

Phytochemische Untersuchung des Rohextraktes aus der Wurzel

Die Verwendung der Wurzel von *M. pyrifolia* in der traditionellen Malariatherapie ist nicht belegt. Da dieser Pflanzenteil jedoch verfügbar war, wurden die hergestellten Wurzelrohextrakte dem *in-vitro*-Testsystem zugeführt. Infolge der beobachteten antiplasmodialen Wirkung des lipophilen Wurzelrohextraktes (IC₅₀-Wert: 8,3 µg/ml [PoW], 11,4 µg/ml [Dd2]) wurde die gesamte Probenmenge an einer Kieselgelsäule aufgetrennt. Aufgrund der geringen Substanzmenge konnten die im Laufe der phytochemischen Aufarbeitung erhaltenen Fraktionen dem antiplasmodialen Test nicht zugeführt werden.

2.5.1.5 Isolierung und Strukturaufklärung von Stigmasterol (19)

Fraktion 5 des lipophilen Wurzelextraktes von *M. pyrifolia* wurde mittels präparativer DC aufgearbeitet, wobei die Verbindung **19** isoliert wurde. Die Strukturaufklärung erfolgte durch EI-Massenspektren und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (siehe Kap. 5.11.5.). Im EI-Massenspektrum war ein Molekülion-Peak bei m/z 412 erkennbar. Die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) auftretenden Signale bei δ 5,21 ppm (1H, *dd*, $J = 8$ Hz, 15 Hz, H-22 oder H-23) und 5,09 ppm (1H, *dd*, $J = 8$ Hz, 15 Hz, H-23 oder H-22) deuteten auf zwei *trans*-ständige olefinische Protonen hin. Ein zusätzliches Signal in diesem Bereich bei δ 5,17 ppm (1H, *m*, H-6) wies auf ein weiteres olefinisches Proton hin. Ein Signal bei δ 3,48 ppm (1H, *m*, H-3) zeigte ein Proton an, das aufgrund der Tieffeldverschiebung einer elektronenziehenden Gruppe benachbart sein mußte. Im Bereich von δ 1,78 ppm bis 1,22 ppm waren Multiplettsignale für insgesamt 26 Protonen sichtbar. Dubletts bei δ 1,06 ppm (3H, *d*, $J = 7$ Hz, H-21) und 0,88 ppm (6H, *d*, $J = 7$ Hz, H-26 und H-27) zeigten drei sekundäre Methylgruppen an. Weiterhin waren Signal bei δ 0,83 ppm (3H, *s*, H-18), 0,82 ppm (3H, *m*, H-29) und 0,60 ppm (3H, *s*, H-19) zu erkennen, die drei weitere Methylgruppen anzeigten. Aus der Anzahl der Methylgruppen, der zahlreichen Signale für Methylengruppen, sowie der Molmasse konnte vermutet werden, dass es sich bei **19** um ein Triterpen handelte. Anhand der Spektraldaten wurde postuliert, dass **19** dem Naturstoff Stigmasterol entspricht.

Stigmasterol wurde darüber hinaus aus Fraktion 5 des lipophilen Wurzelrohextrakts von *M. pyrifolia* (Ernte 2001) mittels präparativer DC isoliert (siehe Kap. 5.10.4.).

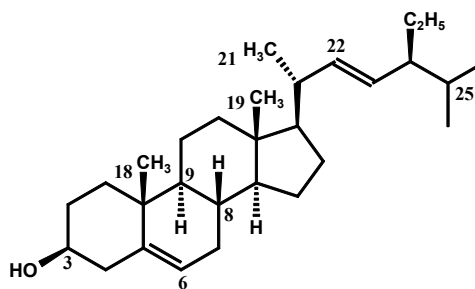


Abb. 51: Strukturaufklärung von Stigmasterol (19)

2.5.2 Phytochemische Untersuchungen der antiplasmodial aktiven lipophilen Rohextrakte von *Microglossa pyrifolia* (Ernte 2001)

Phytochemische Untersuchung des Rohextrakts aus den oberirdischen Pflanzenteilen

Aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *M. pyrifolia* wurde durch Kaltextraktion ein lipophiler Rohextrakt gewonnen, der aufgrund seiner antiplasmodialen Aktivität (IC_{50} -Wert: 21,8 $\mu\text{g/ml}$ [PoW], 40,4 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) an einer RP-18-Säule aufgetrennt wurde. Die erhaltenen Fraktionen 7–10 erwiesen sich als biologisch aktiv und wurden weiter aufgearbeitet (siehe Kap. 5.10.3.). Bei der Aufarbeitung mit Hilfe von Fraktion 10 konnte durch ^1H -NMR-Messung festgestellt werden, dass in Fraktion 10B Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (**14**) angereichert war. Diese Verbindung wurde zuvor bereits aus *C. tenuifolia* isoliert und charakterisiert (siehe Kap. 5.9.7.)

2.5.2.1. Isolierung und Strukturaufklärung von Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (**20**)

Fraktion 7 des lipophilen Rohextraktes wurde aufgrund der beobachteten antiplasmodialen Hemmwirkung (IC_{50} -Wert: 4,1 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) über eine offene Kieselgelsäule aufgetrennt. Aus Fraktion 7B konnte durch präparative DC die Verbindung **20** isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels EI-Massenspektren sowie ^1H -NMR-, ^{13}C - ^1H -COSY- und HMBC-Spektren (siehe Kap. 5.11.6.). Im EI-Massenspektrum war ein Molekülion-Peak bei m/z 272 erkennbar. Weitere Peaks bei m/z 241 und m/z 77 wiesen auf die Abspaltung einer Methoxygruppe und eines unsubstituierten Aromaten hin. Die im ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3) auftretenden Signale bei δ 7,44 ppm (2H, *brd*, $J = 7$ Hz, H-2', H-6'), 7,36 ppm (2H, *m*, H-3', H-5') und 7,34 ppm (1H, *m*, H-4') zeigten ein aromatisches AA'BB'C-System an. Weitere Signale bei δ 7,32 ppm (1H, *m*, H-4) und 6,55 ppm (2H, *d*, $J = 8$ Hz, H-3, H-5) wiesen auf einen 1,2,3-trisubstituierten Aromaten hin. Ein Singulett bei δ 3,80 ppm (6H, OCH_3) zeigte die Anwesenheit zweier Methoxygruppen an. Ein zusätzliches Signal war bei δ 5,38 ppm (2H, *s*, H-7') erkennbar, dem mittels des ^{13}C - ^1H -COSY-Spektrums (MeOD) ein Signal bei δ 67,0 ppm zugeordnet werden konnte. Im ^{13}C - ^1H -COSY-Spektrum lagen im Tieffeldbereich die Signale für acht aromatische C-Atome. Weiterhin konnte das Signal bei höherem Feld (δ 56,0 ppm) den Methoxy-C-Atomen zugeordnet werden. Im HMBC-Spektrum (MeOD) waren Korrelationen der Methylengruppe bei δ 5,38 ppm zu den Protonen H-2' und H-6' des aromatischen

AA'BB'C-Systeme sichtbar. Zusätzlich konnten eine Korrelation von der Methylengruppe zu einer Carbonylgruppe (δ 167 ppm) festgestellt werden. Die aufgrund des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums vermuteten Substitutionsmuster beider Aromaten konnten durch entsprechende Korrelationen im HMBC-Spektrum bestätigt werden. Anhand aller vorhandenen Spektraldaten wurde postuliert, dass es sich bei Verbindung **20** um Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat handelte. Durch Literaturdaten konnte dies bestätigt werden (Anthonsen *et al.*, 1971). Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat wurde erstmalig aus *Solidago virgaurea* L. (Asteraceae) isoliert (Anthonsen *et al.*, 1971).

Die aus der Aufarbeitung von Fraktion 7 gewonnene aktive Fraktion 7C (IC_{50} -Wert: 10,1 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) wurde über eine offene Kieselgelsäule aufgetrennt. Durch $^1\text{H-NMR}$ -Messung konnte in der erhaltenen Fraktion 7C1 ebenfalls die Verbindung **20** detektiert werden (siehe Kap. 5.10.3.).

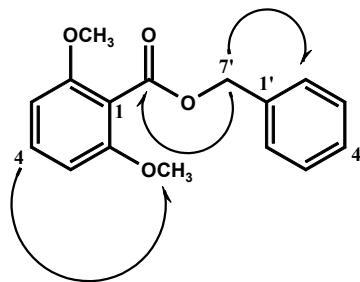


Abb. 52: Strukturaufklärung von Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (20) mit ausgewählten HMBC-Korrelationen

2.5.2.2 Isolierung und Strukturaufklärung von 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon [Acacetin] (21)

Aus der Fraktion 7C2, die nach der säulenchromatographischen Auftrennung der Fraktion 7C des lipophilen Rohextraktes der untersuchten Droge erhalten wurde, konnte mittels präparativer DC die Verbindung **21** isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte durch EI-Massenspektren und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (siehe Kap. 5.11.7.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 284 und weitere charakteristische Peaks bei m/z 151 und m/z 132. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) war dem der Verbindung **9** (siehe Kap. 2.4.1.2.) sehr ähnlich. Auftretende Dubletts bei δ 8,03 (2H, *d*, $J = 9$ Hz, H-2', H-6') und 7,13 (2H, *d*, $J = 9$ Hz, H-3', H-5') zeigten ein aromatisches AA'BB'-System an. Zwei weitere Dubletts bei δ 6,55 (1H, $J = 2$ Hz, H-6 oder H-8) und 6,27 (1H, $J = 2$ Hz, H-8

oder H-6) wiesen auf einen 1,2,3,5-tetrasubstituierten Aromaten hin. Ein Singulett bei δ 12,98 (1H) konnte einer Hydroxygruppe an Position 5 eines Flavons (Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-C-Atom) zugeordnet werden. Ein weiteres Singulett bei δ 3,95 (3H) zeigte die Anwesenheit einer Methoxygruppe an. Alle vorhandenen Daten, einschließlich der beiden MS-Fragmente bei m/z 151 und m/z 132, führten zu der Schlussfolgerung, dass **21** dem 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon [Acacetin] entsprach.

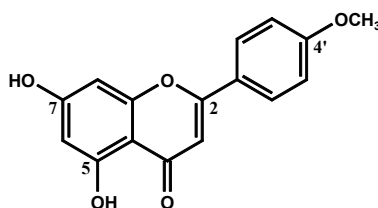


Abb. 53: Strukturaufklärung von 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon [Acacetin] (21)

2.5.2.3 Isolierung und Strukturaufklärung von 13-Hydroxy-9Z,15Z,11E-octadecatriensäure (22)

Aus der biologisch aktiven Fraktion 7D (IC_{50} : 2,5 μ g/ml [Dd2]) konnte mittels präparativer DC die Verbindung **22** isoliert werden. Die Molekülstruktur konnte durch EI-Massenspektren, 1H -NMR- und 1H - 1H -COSY-Spektren aufgeklärt werden (siehe Kap. 5.11.8.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 294 sowie weitere charakteristische Peaks bei m/z 225, 207 und 69. Im 1H -NMR-Spektrum (Aceton- D_6) waren Signale bei δ 1,63–1,28 ppm (14H, *m*) und 0,92 ppm (3H, *t*, $J = 7$ Hz, H-18) sichtbar, die auf eine unverzweigte Alkylkette hinwiesen. Der Peak bei δ 6,52 ppm (1H, *dd*, $J = 10$ Hz, 15 Hz, H-11) zeigte ein olefinisches Proton an, welches mit einem *trans*-ständigen Proton Korrelationen aufwies. Im 1H - 1H -COSY-Spektrum waren Korrelationen dieses Protons zu den Signalen bei δ 5,96 ppm (1H, *t*, $J = 10$ Hz, H-10) und 5,72 ppm (1H, *dd*, $J = 6$ Hz, 15 Hz, H-12) erkennbar, wobei letzteres eine zusätzliche Korrelation zu einem Quartett bei δ 4,21 ppm (1H, $J = 6$ Hz, H-13) aufwies. Diese Signale deuteten auf eine *trans*-Doppelbindung hin, die einer *cis*-Doppelbindung und einer Hydroxymethylengruppe benachbart sein mußte. Das Multipllett bei δ 5,50–5,31 ppm (3H, *m*, H-9, H-15, H-16) zeigte drei weitere olefinische Protonen an. Aus dem 1H - 1H -COSY-Spektrum war ersichtlich, dass die endständige Methylgruppe bei δ 0,92 ppm (H-18) einer Methylengruppe benachbart war, die wiederum Korrelationen zu den

olefinischen Protonen bei δ 5,50–5,31 ppm (H–9, H–15, H–16) aufwies. Weiterhin war im ^1H – ^1H –COSY–Spektrum zu erkennen, dass die Hydroxymethylengruppe bei δ 4,21 ppm (1H, *q*, $J = 6$ Hz, H–13) einer Methylengruppe bei δ 2,25 ppm (2H, *t*, $J = 10$ Hz, H–14) benachbart war, welche auch Korrelationen zu den olefinischen Protonen bei δ 5,50–5,31 ppm (H–9, H–15, H–16) zeigte. Anhand aller Spektraldaten konnte geschlussfolgert werden, dass es sich bei **22** um 13–Hydroxy–9*Z*,15*Z*,11*E*–octadecatriensäure handelte. Die MS–Peaks bei m/z 225 und m/z 69 zeigten die Abspaltung eines C_5H_9 –Fragments. Eine H_2O –Abspaltung aus dem Restmolekül zeigte der Peak bei m/z 207 an. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit den Literaturdaten von synthetisierter 13–Hydroxy–9*Z*,15*Z*,11*E*–octadecatriensäure zeigte sehr gute Übereinstimmungen (Reddy *et al.*, 1994). Die Verbindung wurde zuvor aus *Oryza sativa* L. (Poaceae) isoliert (Yadav *et al.*, 1990).

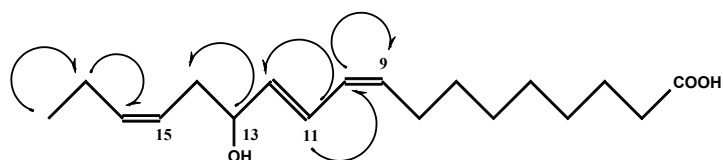


Abb. 54: Strukturaufklärung von 13–Hydroxy–9*Z*,15*Z*,11*E*–octadecatriensäure (22**) mit ausgewählten ^1H – ^1H –COSY–Korrelationen**

2.5.2.4 Isolierung und Strukturaufklärung von 1–Hydroxycalamenen (**23**) und (**24**)

Die Aufarbeitung der aktiven Fraktion 8 (IC_{50} : 17,7 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) des lipophilen Rohextraktes erfolgte über eine offene Kieselgelsäule. Die erhaltenen Fraktionen 8B–8D erwiesen sich ebenfalls als biologisch aktiv und wurden weiter aufgetrennt. Aus Fraktion 8B (IC_{50} –Wert: 11,9 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) konnten mittels präparativer DC die Verbindungen **23** und **24** isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte durch EI–Massenspektren und ^1H –NMR–Spektren (siehe Kap.5.11.9.). Im EI–Massenspektrum war ein Molekülion–Peak bei m/z 218 erkennbar. Weitere Peaks bei m/z 200, 175, 157 und 43 zeigten die Abspaltung von H_2O sowie einer Isopropyleinheit an. Die im ^1H –NMR–Spektrum (Aceton– D_6) sichtbaren Signale deuteten daraufhin, dass es sich bei **23** und **24** um zwei Isomere (I und II) handelt (siehe Tabelle 28 im Kapitel 5.11.9.). Auftretende Signale bei δ 7,49 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H–8), 7,02 ppm (1H, *brs*, H–5) sowie 6,97 ppm (1H, *m*, H–7) wiesen auf einen 1,2,5–trisubstituierten Aromaten hin. Weitere Signale bei δ 2,70 ppm (2H, *m*, H–4) und im Bereich von δ 1,70–2,02 ppm (10H, *m*, H–9 und CH_2) zeigten Methylen– und Methingruppen eines aliphatischen 1,2,3,4–tetrasubstituierten Sechsrings an. Zusätzliche

Signale bei δ 2,25 ppm (3H, *s*), 1,41 ppm (3H, *s*), 1,35 ppm (3H, *d*, $J = 7$ Hz) und 0,68 ppm (3H, *d*, $J = 7$ Hz) zeigten die Anwesenheit von vier Methylgruppen an. Aufgrund der Spektraldaten wurde vermutet, dass es sich bei **23** und **24** um zwei Isomere eines Sesquiterpens vom Cadinantyp handelte. Aus den Integralen der Peaks im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war zu erkennen, dass Isomer II die Hauptkomponente darstellte. Isomer I unterschied sich vom zweiten Isomer in den chemischen Verschiebungen des aromatischen Protons bei δ 7,46 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H-8) sowie in den chemischen Verschiebungen dreier Methylgruppen. Die Spektraldaten der Methylgruppen sind in Tabelle 13 angegeben.

Tab. 13:

$^1\text{H-NMR}$ -Spektraldaten (400 MHz, CDCl_3 , δ in ppm) der Methylgruppen der Isomere I und II von 1-Hydroxycalamenen (23** und **24**)**

	Isomer I δ in ppm	Isomer II δ in ppm
CH_3	2,25 (6H, <i>s</i>)	
CH_3	1,41 (3H, <i>s</i>)	1,43 (3H, <i>s</i>)
CH_3	1,35 (3H, <i>d</i> , $J = 7$ Hz)	1,30 (3H, <i>d</i> , $J = 7$ Hz)
CH_3	0,68 (3H, <i>d</i> , $J = 7$ Hz)	0,76 (3H, <i>d</i> , $J = 7$ Hz)

Aus der Gesamtheit der Daten konnte geschlussfolgert werden, dass die Verbindungen **23** und **24** zwei Isomeren von 1-Hydroxycalamenen entsprachen. Durch Literaturdaten konnte dies bestätigt werden (El-Seedi *et al.*, 1994). 1-Hydroxycalamenen wurde zuvor aus *Siparuna macrotrepala* PERKINS (Monimiaceae) isoliert, wobei keine Angaben über das vorliegende Isomer gemacht wurden (El-Seedi *et al.*, 1994). Anhand der verfügbaren Daten konnten keine Aussagen darüber erfolgen, welche Diastereomere vorlagen. Eine weitere Auftrennung von 1-Hydroxycalamenen war aufgrund der geringen Substanzmenge nicht möglich.

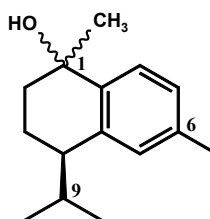


Abb. 55: Strukturaufklärung von 1-Hydroxycalamenen (23** und **24**)**

2.5.2.5 Isolierung und Strukturaufklärung von Strictinsäure (25)

Aus der aktiven Fraktion 8C (IC₅₀: 17,7 µg/ml [Dd2]) konnte durch präparative DC die Verbindung **25** gewonnen werden. Die Molekülstruktur konnte durch EI-Massenspektren, ¹H-NMR- und ¹H-¹H-COSY-Spektren aufgeklärt werden (siehe Kap.5.11.10.). Im EI-Massenspektrum waren ein Molekülion-Peak bei *m/z* 314 sowie ein weiterer charakteristischer Peak bei *m/z* 95 erkennbar. Im ¹H-NMR-Spektrum (Aceton-D₆) auftretende Signale bei δ 7,44 ppm (1H, *brt*, *J* = 2 Hz, H-15), 7,38 ppm (1H, *brs*, H-16) und 6,39 ppm (1H, *brs*, H-14) ließen auf einen Furanring schließen. Dies konnte durch den auftretenden Fragmentpeak bei *m/z* 95 bestätigt werden, der der Abspaltung einer CH₂-CH₂-Furan-Einheit entsprach. Weitere Signale bei δ 7,24 ppm (1H, *d*, *J* = 6 Hz, H-3) und 6,00 ppm (1H, *td*, *J* = 2 Hz, 12 Hz, H-2) deuteten auf olefinische Protonen hin, wobei die Tieffeldverschiebung die Nachbarschaft einer elektronenziehenden Gruppe vermuten ließ. Im ¹H-¹H-COSY-Spektrum waren Kopplungen zwischen beiden Protonen sichtbar (H-2 und H-3), sowie die Korrelation zu einem weiteren olefinischen Proton bei δ 5,45 ppm (1H, *tdd*, *J* = 2 Hz, 4 Hz, 12 Hz, H-1), welches wiederum einer Methylengruppe bei δ 2,26 ppm (1H, *m*) und 1,88 ppm (1H, *m*) benachbart war. Zwei charakteristische Signale bei δ 5,00 ppm (1H, *t*, *J* = 2 Hz, H-18) und 4,82 ppm (1H, *brs*, H-18) wiesen auf eine Exomethylengruppe hin. Zusätzliche Signale bei δ 0,76 ppm (3H, *s*, H-20) und bei δ 0,79 ppm (3H, *brd*, *J* = 6 Hz, H-17) konnten zwei Methylgruppen zugeordnet werden, wobei letztere Korrelationen zu einem Proton bei δ 2,15 ppm (1H, *m*, H-8) zeigte. Dieses wiederum wies Kopplungen zu einer Methylengruppe bei δ 2,75 ppm (1H, *m*, H-7) und 2,44 ppm (1H, *m*, H-7) auf. Aufgrund der spektroskopischen Daten wurde vermutet, dass es sich bei Verbindung **25** um das Furanoditerpen Strictinsäure handelt. Durch Literaturdaten konnte dies bestätigt werden (Tandon *et al.*, 1979). Strictinsäure wurde zuvor aus *Conyza stricta* WILLD. (Asteraceae) isoliert (Tandon *et al.*, 1979). Welches Isomer von Strictinsäure vorliegt, konnte anhand der Literaturdaten nicht geklärt werden. In der Literatur werden für Diterpene vom Clerodantyp die Methylgruppen als α-ständig angegeben. Aus diesem Grund nehmen wir an, dass die Methylgruppen an Position 17 und 20 α-ständig zum Grundgerüst angeordnet sind. Strictinsäure konnte mittels präparativer DC ebenfalls aus Fraktion 9C4 des lipophilen Rohextraktes von *M. pyrifolia* isoliert werden (siehe Kap. 5.10.3.).

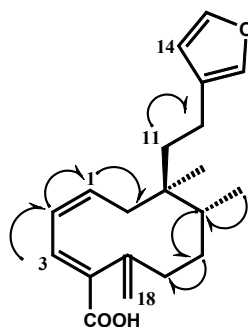


Abb. 56: Strukturaufklärung von Strictinsäure (25) (rel. Konfiguration) mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY-Korrelationen

2.5.2.6 Isolierung und Strukturaufklärung von 10α -Nidoresedasäure (26) und 10β -Nidoresedasäure (27)

Die Aufarbeitung der aktiven Fraktion 9 des lipophilen Rohextraktes (IC_{50} : 18,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [Dd2]) erfolgte über eine Kieselgelsäule, wobei die biologisch aktiven Fraktionen 9B und 9C erhalten wurden. Aus Fraktion 9B (IC_{50} : 26,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [PoW]) wurden durch präparative DC die Verbindungen **26** und **27** als Gemisch isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte durch EI-Massenspektren, ^1H -NMR- und ^1H - ^1H -COSY-Spektren (siehe Kap. 5.11.11.). Im EI-Massenspektrum waren ein Molekülion-Peak bei m/z 314, sowie weitere charakteristische Peaks bei m/z 219 und 81 erkennbar. Das ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3) war dem der Verbindung **25** sehr ähnlich. Die Signale deuteten daraufhin, dass es sich bei **26** und **27** um zwei Isomere handelte (siehe Tab. 29 in Kap.5.11.11.). Durch Vergleich mit den entsprechenden ^1H -NMR-Daten von **25**, konnten die Signale bei δ 7,31 ppm (1H, *s*, H-15), 7,19 ppm (1H, *s*, H-16) und 6,25 ppm (1H, *s*, H-14) einem Furanring zugeordnet werden. Weitere Signale bei δ 6,87 ppm (1H, *d*, $J = 5$ Hz, H-3) und im Bereich 6,23–6,19 ppm (1H, *m*, H-2) deuteten auf zwei olefinische Protonen hin, die aufgrund der Tieffeldverschiebung einer elektronenziehenden Gruppe benachbart sein mußten. Das Signal bei δ 6,07 ppm (1H, *dd*, $J = 6$ Hz, 9 Hz, H-1) konnte einem weiteren olefinischen Proton zugeordnet werden und zeigte eine Dien-Einheit an. Dies konnte durch entsprechende Korrelationen, die im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum auftraten, bestätigt werden. Ein weiteres Signal trat bei δ 2,21 ppm (1H, *m*, H-10) auf, das im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum Korrelationen zu dem Proton bei δ 6,07 ppm (H-1) zeigte. Zusätzliche Signale bei δ 0,89 ppm (3H, *s*, H-20) und δ 1,00 ppm (3H, *d*, $J = 7$ Hz, H-17) konnten jeweils einer tertiären und einer sekundären Methylgruppen zugeordnet werden. Anhand der Spektraldaten ließ sich vermuten, dass es sich bei den Verbindungen **26** und **27** um

Isomere eines Furanoditerpens handelte. Diese Annahme konnte bestätigt werden durch die charakteristischen Peaks bei m/z 219 und 81 im EI–Massenspektrum, die der Abspaltung einer CH_2 –Furan–Einheit entsprachen. Das zweite Isomer des isolierten Furanoditerpens unterschied sich vom ersten in den chemischen Verschiebungen folgender auftretender Signale im ^1H –NMR–Spektrum (CDCl_3): in der chemischen Verschiebung des Signals eines Protons des Furanringes bei δ 6,23 ppm (1H, *s*, H–14) und den Signalen zweier olefinischer Protonen bei δ 6,93 ppm (1H, *d*, $J = 5$ Hz, H–3) und 6,20 ppm (1H, *m*, H–1). Weiterhin war ein Signal bei δ 2,40 ppm (1H, *m*, H–10) erkennbar, das im ^1H – ^1H –COSY–Spektrum Korrelationen zum olefinischen Proton bei δ 6,20 ppm (H–1) aufwies. Ein Singulett bei δ 1,05 ppm (3H, *s*, H–20) und ein Dublett bei δ 0,83 ppm (3H, *d*, $J = 7$ Hz, H–17) wurden jeweils einer tertiären und einer sekundären Methylgruppe zugeordnet. Aus der Gesamtheit aller Spektraldaten konnte geschlossen werden, dass es sich bei **26** und **27** um die Isomere 10 α –Nidoresedasäure (**26**) und 10 β –Nidoresedasäure (**27**) handelte. Dies konnte durch Literaturdaten der Methylester von 10 α –Nidoresedasäure (Singh *et al.*, 1988) und 10 β –Nidoresedasäure (Bohlmann *et al.*, 1978) bestätigt werden. Die Peakintegration im ^1H –NMR–Spektrum zeigte, dass das α –Isomer (**26**) die Hauptkomponente darstellte.

Tab. 14:

^1H –NMR–Spektraldaten (400 MHz, CDCl_3 , δ in ppm) der Isomere I und II von 10 α –Nidoresedasäure (**26**) und 10 β –Nidoresedasäure (**27**)

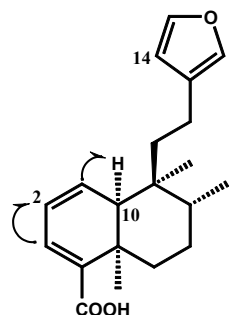
10 α – Nidoresedasäure (26)		10 β – Nidoresedasäure (27)
δ in ppm		δ in ppm
H–15	7,31 (2H, <i>brs</i>)	
H–16	7,19 (2H, <i>s</i>)	
H–3	6,87 (1H, <i>d</i> , $J = 5$ Hz)	6,93 (1H, <i>d</i> , $J = 5$ Hz)
H–14	6,25 (1H, <i>s</i>)	6,23 (1H, <i>s</i>)
H–2	6,23–6,19 (2H, <i>m</i>)	
H–1	6,07 (1H, <i>dd</i> , $J = 6$ Hz, 9 Hz)	6,20 (1H, <i>m</i>)
H–10	2,21 (1H, <i>m</i>)	2,40 (1H, <i>m</i>)
H–11, H–12	2,38–2,24 (8H, <i>m</i>)	
H–8	1,92 (1H, <i>m</i>)	1,60 (1H, <i>m</i>)

Tab. 14: Fortsetzung

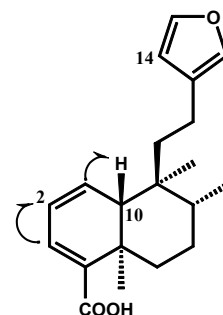
10 α - Nidoresedasäure (26)		10 β - Nidoresedasäure (27)
δ in ppm		δ in ppm
H-6, H-7	1,71–1,30 (8H, <i>m</i>)	
H-18	1,13 (3H, <i>s</i>)	0,88 (3H, <i>s</i>)
H-20	0,89 (3H, <i>s</i>)	1,05 (3H, <i>s</i>)
H-17	1,00 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz)	0,83 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz)

In der Literatur wurden für beide Naturstoffe die Positionen der Methylgruppen als α -ständig angegeben. Nidoresedasäure wurde zuvor aus *Nidorella resedifolia* DC. (Asteraceae) isoliert (Bohlmann *et al.*, 1978).

10 β -Nidoresedasäure (**27**) wurde nochmals aus Fraktion 9C/1 des lipophilen Rohextraktes isoliert und lag in Form von Kristallen als 1:1-Gemisch mit Verbindung **28** vor (siehe Kap. 5.10.3.).

10 α -Nidoresedasäure (**26**)

(rel. Konfiguration)

10 β -Nidoresedasäure (**27**)

(rel. Konfiguration)

Abb. 57: Strukturaufklärung von 10 α -Nidoresedasäure (26**) und 10 β -Nidoresedasäure (**27**) mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY-Korrelationen**

2.5.2.7 Isolierung und Strukturaufklärung von Hardwickiasäure (**28**)

Aus der antiplasmodial aktiven Fraktion 9C (IC₅₀: 24,3 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]) wurde nach der Fraktionierung über eine Kieselgelsäule die Fraktion 9C/1 erhalten, welche nach Einengen des Lösemittels und Lagerung bei -5°C farblose Kristalle bildete. Anhand von ^1H -NMR-Messungen konnte festgestellt werden, dass die Kristalle einem 1:1-Gemisch der

Verbindungen **27** und **28** entsprachen. Eine weitere Auftrennung der beiden Verbindungen war aufgrund gleicher chromatographischer Parameter nicht möglich. Die Strukturaufklärung erfolgte durch EI–Massenspektren, ^1H –NMR– und ^1H – ^1H –COSY–Spektren (siehe Kap. 5.11.12.). Im EI–Massenspektrum war ein Molekülion–Peak bei m/z 316 erkennbar. Zwei weitere charakteristische Peaks bei m/z 221 und 81 wiesen auf die Abspaltung einer CH_2 –Furan–Einheit hin. Aufgrund der hohen Übereinstimmung in den chromatographischen Parametern sowie der sehr ähnlichen ^1H –NMR–Spektren von **27** und **28**, wurde vermutet, dass sich beide Verbindungen nur geringfügig in ihren Molekülstrukturen unterschieden. Das ^1H –NMR–Spektrum von **28** (CDCl_3) zeigte ebenfalls die charakteristischen Signale für einen Furanring bei δ 7,34 ppm (1H, *brs*, H–15), 7,13 ppm (1H, *s*, H–16) und 6,19 ppm (1H, *s*, H–14). Das Vorliegen eines Diterpens vom Clerodantyp wurde weiterhin bestätigt durch charakteristische Peaks bei δ 1,26 ppm (3H, *s*, H–18), 0,86 ppm (3H, *d*, $J = 7$ Hz, H–17) und 0,76 ppm (3H, *s*, H–20), welche den Methylgruppen zugeordnet werden konnten. Das Signal bei δ 6,86 ppm (1H, *t*, $J = 3$ Hz, H–3) zeigte ein olefinisches Proton an, welches im ^1H – ^1H –COSY–Spektrum Korrelationen zu einer Methylengruppe bei δ 2,35 ppm (2H, *m*, H–2) aufwies, die wiederum einer weiteren hochfeldverschobenen Methylengruppe bei δ 1,51 ppm (2H, *m*, H–1) benachbart war. Aufgrund der spektroskopischen Daten wurde vermutet, dass es sich bei **28** um Hardwickiasäure handelte. Dies konnte durch einen Vergleich der Daten mit den entsprechenden Literaturwerten bestätigt werden (Heymann *et al.*, 1994). Hardwickiasäure wurde zuvor u.a. aus *Copaifera officinalis* (JACQ.) L. (Caesalpiniaceae) isoliert (Cocker *et al.*, 1965).

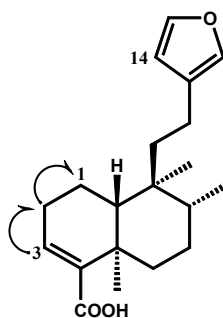


Abb. 58: Strukturaufklärung von Hardwickiasäure (28)
(rel. Konfiguration) mit ausgewählten ^1H – ^1H –COSY–Korrelationen

2.5.2.8 Isolierung und Strukturaufklärung von 1-Acetyl-6E,10E,14E-geranylgeraniol-19-carbonsäure (29)

Die aus der säulenchromatographischen Auftrennung von Fraktion 9 des lipophilen Rohextraktes erhaltene Fraktion 9C3 wurde mittels präparativer DC aufgearbeitet, was zur Isolierung von **29** führte. Die Aufklärung der Molekülstruktur erfolgte mittels (–)-FAB-MS-Messungen sowie $^1\text{H-NMR}$ - und $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -Spektren (siehe Kap. 5.11.13.). Das negative FAB-MS-Spektrum zeigte für $[\text{M-H}]^-$ ein Signal bei m/z 361. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Molmasse der Verbindung m/z 362 entsprach. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war dem von Verbindung **17** sehr ähnlich (siehe Kap. 5.11.3.). Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) auftretende Signale bei δ 6,77 ppm (1H, *t*, $J = 7$ Hz, H-6), 5,39 ppm (1H, *tq*, $J = 1$ Hz, 7 Hz, H-2), 5,19 ppm (1H, *tq*, $J = 1$ Hz, 7 Hz, H-10) und 5,10 ppm (1H, *tq*, $J = 1$ Hz, 7 Hz, H-14) zeigten die Anwesenheit von vier Doppelbindungen an. Zusätzliche Signale bei δ 2,41–2,33 ppm (4H, *m*, H-4, H-5), 2,25–2,12 ppm (4H, *m*, H-9, H-13) und 4,59 ppm (2H, *d*, $J = 7$ Hz, H-1) waren sichtbar und wiesen auf Methylen- sowie eine Hydroxymethylengruppe hin. Singulets bei δ 1,72 ppm (3H, H-20), 1,66 ppm (3H, H-18), 1,60 ppm (3H, H-16 oder H-17) und 1,59 ppm (3H, H-17 oder H-16) zeigten vier Methylgruppen an. Alle Spektraldaten deuteten daraufhin, dass es sich bei **29** um einen Naturstoff mit einem Geranylgeraniolgrundkörper handelte. Ein im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3) zusätzlich auftretendes Singulett bei δ 2,05 ppm (3H, *s*, OAc) wies auf eine Acetatgruppe hin. Im Vergleich mit den Spektraldaten von **17** zeigten die Protonen an Position 1 eine Tieffeldverschiebung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) mit einem Signal bei δ 4,59 ppm (2H, *d*, $J = 7$ Hz, H-1), was auf die Veresterung mit Essigsäure zurückgeführt werden konnte. Im $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -Spektrum waren die Korrelationen zwischen den olefinischen Protonen an H-14, H-10 und H-6 und der jeweils benachbarten Methylengruppe an H-13, H-9 und H-5 sichtbar. Die spektroskopischen Daten ließen vermuten, dass es sich bei Verbindung **29** um 1-Acetyl-6E,10E,14E-geranylgeraniol-19-carbonsäure handelte. 1-Acetyl-6E,10E,14E-geranylgeraniol-19-carbonsäure ist ein neuer Naturstoff, bislang konnte nur das 6Z-Isomer aus *Mikania congesta* DC. (Asteraceae) isoliert werden (Herz *et al.*, 1985). Die Fraktion 9C4, welche aus der Aufarbeitung von Fraktion 9C hervorging, wurde mittels präparativer DC aufgereinigt, wobei u.a. das Zweikomponentengemisch 9C4/A erhalten wurde (siehe Kap. 5.10.3.). Weitere Auftrennung von 9C4/A führte zur erneuten Isolierung von 1-Acetyl-6E,10E,14E-geranylgeraniol-19-carbonsäure.

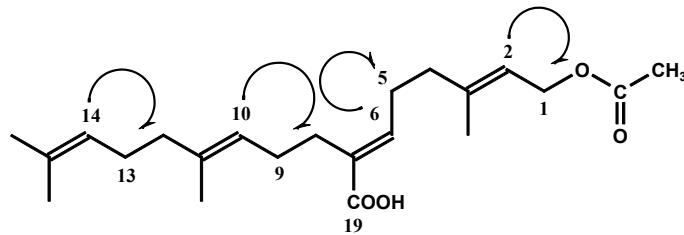


Abb. 59: Strukturaufklärung von 1-Acetyl-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol-19-carbonsäure (29) mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY-Korrelationen

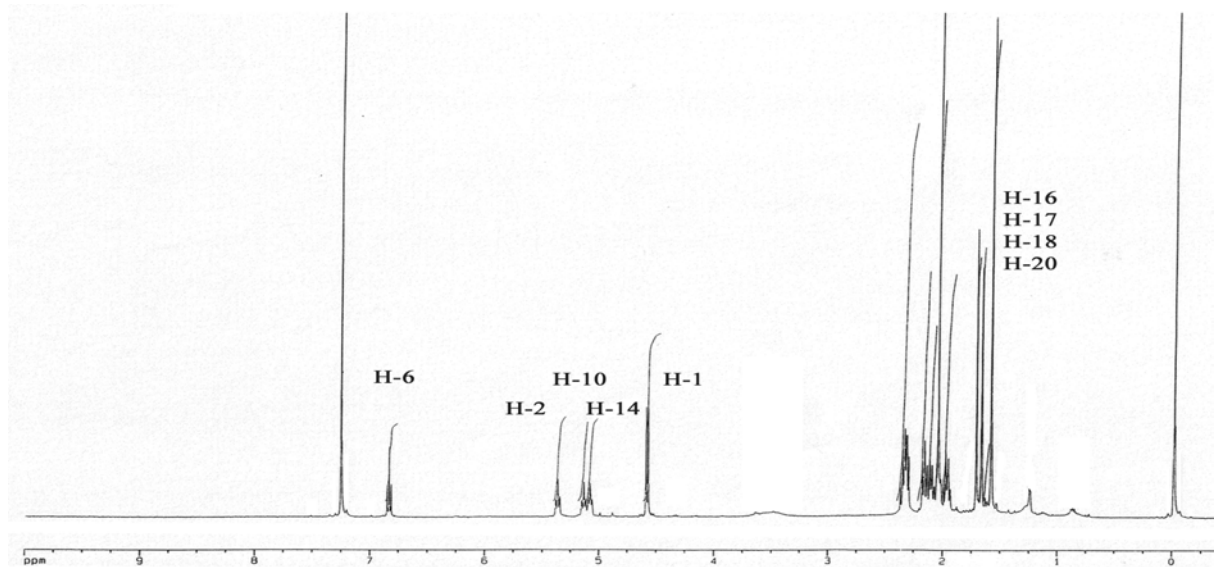


Abb. 60:

^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von
1-Acetyl-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol-19-carbonsäure (29)

2.5.2.9 Isolierung und Strukturaufklärung von 19-Oxo-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (30)

Die Aufreinigung des Zweikomponentengemisches 9C4/A, welches nach der Aufarbeitung der Fraktion 9C4 erhalten wurde, führte zur Isolierung von Verbindung **30**. Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte zur Strukturaufklärung nur das ^1H -NMR-Spektrum herangezogen werden (siehe Kap. 5.11.14.). Da das EI-Massenspektrum von **30** nicht auswertbar war, wäre zur Bestimmung der Molmasse eine FAB-MS-Messung notwendig gewesen. Dies war aufgrund der Lösemittelinstabilität der Substanz nicht möglich. Das ^1H -NMR-Spektrum (Aceton-D_6) war dem von Verbindung **17** sehr ähnlich, was vermuten ließ, dass es sich bei **30** ebenfalls um einen Geranylgeraniolgrundkörper handelte (Vergleich mit Kap. 5.11.3.). Signale bei δ 6,58 ppm (1H, *t*, $J = 7$ Hz, H-6), 5,44 ppm (1H,

tq, $J = 1$ Hz, 7 Hz, H-2), 5,15 ppm (1H, *m*, H-10) und 5,10 ppm (1H, *m*, H-14) wiesen auf vier Doppelbindungen hin. Singulets bei δ 1,68 ppm (3H, H-20), 1,66 ppm (3H, H-18), 1,59 ppm (3H, H-16 oder H-17) und 1,58 ppm (3H, H-17 oder H-16) zeigten vier Methylgruppen an. Ein zusätzliches Signal bei δ 9,38 ppm (1H, *s*, H-19) deutete auf die Anwesenheit einer Aldehydgruppe hin. Das Signal der Protonen an Position 1 bei δ 4,09 ppm (2H, *d*, $J = 7$ Hz, H-1) zeigte eine ähnliche chemische Verschiebung wie H-1 von **17**. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass auch bei Verbindung **30** eine freie endständige Hydroxymethylengruppe im Molekül vorliegt. Aufgrund der $^1\text{H-NMR}$ -Daten wurde postuliert, dass Verbindung **30** dem Naturstoff 19-Oxo-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol entspricht. Ein Vergleich der Spektraldaten mit Literaturangaben war nicht möglich, da bislang über die Isolierung dieses Naturstoffes nicht berichtet wurde.

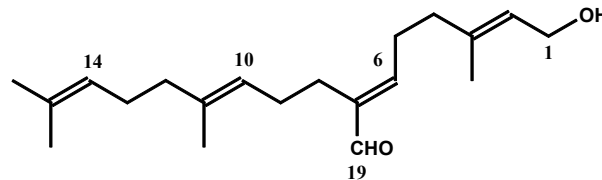


Abb. 61: Strukturaufklärung von 19-Oxo-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**30**)

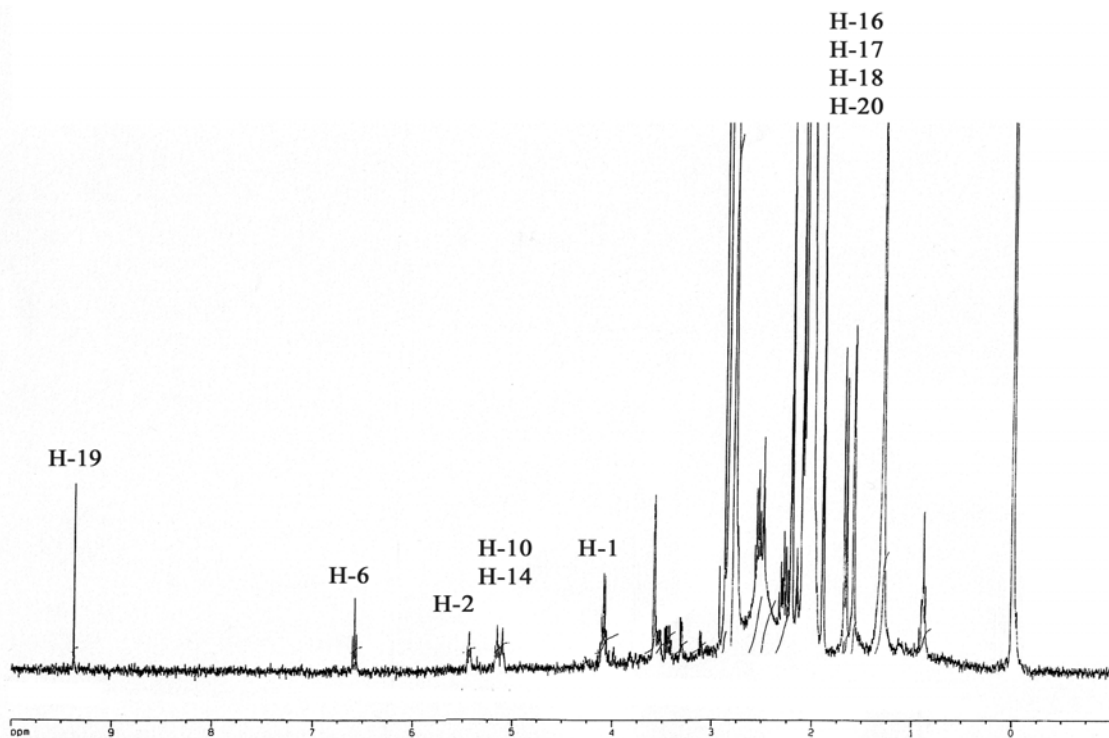


Abb. 62:

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, Aceton- D_6)

von 19-Oxo-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**30**)

2.5.3 Phytochemische Untersuchungen des wässrigen Auszugs von *Microglossa pyrifolia* (Ernte 2001)

Der biologisch inaktive Rückstand des wässrigen Auszuges der oberirdischen Pflanzenteile von *M. pyrifolia* wurde über eine RP-18-Säule aufgetrennt, wobei die antiplasmodial aktiven Fraktionen 5–8 erhalten wurden (siehe Kap. 5.10.3.). Mittels $^1\text{H-NMR}$ - und MS-Spektren konnte in Fraktion 5 (IC_{50} -Wert: 24,6 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) das Flavon 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] (**8**) und in Fraktion 6 (IC_{50} -Wert: 31,7 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) das Diterpen Strictinsäure (**25**) detektiert werden. Weiterhin konnte anhand von spektroskopischen Messungen festgestellt werden, dass in Fraktion 7 (IC_{50} -Wert: 14,7 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) der Naturstoff 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) enthalten war.

2.5.4 Phytochemische Untersuchungen des antiplasmodial aktiven lipophilen Rohextrakts aus den Wurzeln von *Microglossa pyrifolia* (Ernte 2001)

Aus den Wurzeln der Pflanze wurde durch Kaltextraktion ein lipophiler Rohextrakt (PE-EtOAc 1:1) gewonnen, der aufgrund seiner antiplasmodialen Aktivität (IC_{50} -Wert: 17,3 $\mu\text{g/ml}$ [PoW], 40,2 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) an einer Kieselgelsäule aufgetrennt wurde, wobei die biologisch aktiven Fraktionen 4 und 5 erhalten wurden (siehe Kap. 5.10.4.).

2.5.4.1 Isolierung und Strukturaufklärung von 8-Methyl- β -naphthol (**31**)

Fraktion 4 des lipophilen Wurzelextraktes (IC_{50} -Wert: 32,5 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) wurde mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt, was zur Isolierung der Verbindung **31** führte. Zur Aufklärung der Molekülstruktur wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren und EI-MS-Messungen herangezogen (siehe Kap. 5.11.15.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 158. Weitere charakteristische Peaks bei m/z 141 bzw. 128 wiesen auf die Abspaltung einer Hydroxygruppe bzw. einer Methyl- und einer Hydroxyeinheit aus dem Molekül hin. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Aceton- D_6) zeigte Signale bei δ 7,31 ppm (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-1), 7,76 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H-4) und 7,15 ppm (1H, *dd*, $J = 2$ Hz, 8 Hz, H-3) die auf einen 1,2,4-trisubstituierten Aromaten hinwiesen. Zusätzliche Peaks bei δ 7,63 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H-5), 7,25 ppm (1H, *brd*, $J = 8$ Hz, H-7) und 7,16 ppm (1H, *t*, $J = 8$ Hz, H-6) deuteten auf ein weiteres 1,2,3-trisubstituiertes aromatisches System hin. Zwei Singulets bei δ 8,61 ppm (1H, *brs*, OH) und 2,56 ppm (3H, *brs*, H-9) zeigten eine

Hydroxygruppe und eine Methylgruppe an. Aufgrund der spektroskopischen Daten wurde postuliert, dass es sich bei **31** um den Naturstoff 8-Methyl- β -naphthol handelte. Dies konnte durch einen Vergleich der Spektraldaten mit entsprechenden Literaturangaben bestätigt werden (Boeker *et al.*, 1986). Bei 8-Methyl- β -naphthol, das zuvor aus den Wurzeln von *Heterothalamus spartioides* HOOK. AT ARN. EX DC (Asteraceae) isoliert wurde (Boeker *et al.*, 1986), handelt es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt eines Sesquiterpens vom Cadinantyp.

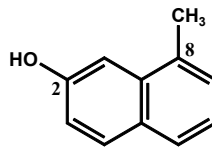


Abb. 63: Strukturaufklärung von 8-Methyl- β -naphthol (31)

2.5.4.2 Charakterisierung eines Acetylgemisches

Fraktion 5 (IC₅₀-Wert: 10,0 μ g/ml [Dd2]) des lipophilen Wurzelrohextraktes wurde durch präparative DC weiter aufgetrennt. Aus der erhaltenen Restfraktion 5A konnte ein Zweikomponentengemisch gewonnen werden, dessen weitere Auftrennung aufgrund der geringen Substanzmenge nicht möglich war. Das ¹H-NMR-Spektrum (Aceton-D₆) führte zu Strukturhinweisen. Auftretende Signale bei δ 5,95 ppm (1H, *dd*, $J = 5$ Hz, 10 Hz), 5,40 ppm (1H, *d*, $J = 10$ Hz) und 5,17 ppm (1H, *d*, $J = 10$ Hz) zeigten eine Vinylgruppe an, wobei die beiden Hochfeldsignale den endständigen Vinylprotonen zugeordnet werden konnten. Ein Multiplett bei δ 5,85 ppm (2H, *m*) wies auf zwei weitere olefinische Protonen hin. Ein Dublett bei δ 4,10 ppm (1H, *d*, $J = 5$ Hz) zeigte das Proton einer Hydroxymethingruppe an, die der Vinylgruppe benachbart sein mußte. Signale im Bereich δ 2,30 ppm bis δ 0,90 ppm deuteten auf eine längere Alkylkette hin. Weitere im ¹H-NMR-Spektrum sichtbare Signale ließen vermuten, dass eine zweite Verbindung mit sehr ähnlichen Strukturmerkmalen vorliegt. Anhand der Spektraldaten wurde vermutet, dass es sich bei dem isolierten Gemisch um zwei Polyacetylene handelte, die Strukturähnlichkeiten mit *cis*-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diyn-3-ol [Falcarinol] aufwiesen. Das antiphlogistisch und antihepatotoxisch wirkende Falcarinol konnte aus mehreren Apiaceen, wie z.B. *Daucus carota* L. isoliert werden (Bohlmann *et al.* 1966).

Rücker und Mitarbeitern (1992) gelang die Isolierung verschiedener Acetylglykoside aus den Blättern von *M. pyrifolia*. Diese besitzen jedoch andere Strukturmerkmale, wie

z.B. das Fehlen einer endständigen Vinylgruppe, als die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Polyacetylene.

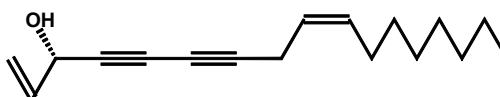


Abb. 64: Strukturaufklärung von *cis*-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diyn-3-ol [Falcarinol] (zum Vergleich)

2.5.5 Synthese von 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**32**)

Um die Struktur von 19-Oxo-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**30**) bestätigen zu können, wurde ausgehend von 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) eine Reduktion mit LiAlH_4 / Diethylether unter N_2 -Atmosphäre durchgeführt (siehe Kap. 5.12.). Als Syntheseprodukt wurde die Verbindung **32** erhalten. Die Durchführung der Synthese mittels des schwächer wirksamen Reduktionsmittels NaBH_4 / Diethylether führte zu keiner Umsetzung von **17**. Die wiederholte Durchführung der Partialsynthese unter Verwendung eines selektiveren Reduktionsmittels war aufgrund der geringen Menge der Ausgangssubstanz **17** nicht möglich. Zur Aufklärung der Molekülstruktur von **32** wurden ^1H -NMR-Spektren und EI-MS-Messungen herangezogen (siehe Kap. 5.12.). Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülion-Peak bei m/z 306. Zwei weitere Peaks bei m/z 288 und 270 wiesen auf H_2O -Abspaltungen hin. Das ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3) war dem von Verbindung **17** sehr ähnlich (siehe Kap. 5.11.3.). Signale bei δ 5,43 ppm (1H, *td*, $J = 7$ Hz, 1 Hz, H-6), 5,39 ppm (1H, *td*, $J = 7$ Hz, 1 Hz, H-2), 5,13 ppm (1H, *t*, $J = 7$ Hz, H-10) und 5,08 ppm (1H, *t*, $J = 7$ Hz, H-14) wiesen auf vier Doppelbindungen hin. Singulett bei δ 1,69 ppm (6H, H-18, H-20) und 1,60 ppm (6H, H-16, H-17) zeigten vier Methylgruppen an. Durch Vergleich mit den Spektraldaten von **17** konnte das Signal bei δ 4,16 ppm (2H, *d*, $J = 7$ Hz, H-1) einer Hydroxymethylengruppe zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass auch bei Verbindung **32** eine endständige Hydroxygruppe im Molekül vorlag. Ein Signal bei δ 4,04 ppm (2H, *brs*, H-19) deutete auf eine weitere Hydroxymethylengruppe hin, die durch Reduktion der Säurefunktion an Position 19 entstanden sein mußte. Aufgrund der spektroskopischen Daten wurde postuliert, dass es sich bei **32** um 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol handelte. Diese Verbindung wurde bisher nicht aus einer Pflanzenart isoliert. Das Isomer 19-

Hydroxy-6*E*,10*Z*,14*E*-geranylgeraniol [Plaunotol] ist zuvor aus *Croton sublyratus* KURZ (Euphorbiaceae) isoliert worden und wird aufgrund seiner antigestirischen Wirkung bei Magenulzera eingesetzt (Vongchareonsathit *et al.*, 1998).

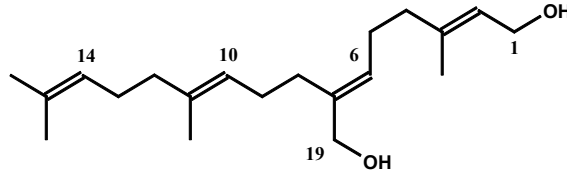


Abb. 65: Strukturaufklärung von 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (32)

2.5.6 Ermittlung der antiplasmodialen Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum*

Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität der Rohextrakte

Von allen Rohextrakten der oberirdischen Pflanzenteile und der Wurzeln von *M. pyrifolia* wurde die *in-vitro*-Aktivität gegenüber den Stamm PoW und dem Klon Dd2 von *P. falciparum* getestet. Es wurde hierbei analog zu der in Kapitel 2.3.2. beschriebenen Methode vorgegangen.

Tab. 15:

In-vitro-Aktivität der Rohextrakte von *Microglossa pyrifolia* gegenüber *Plasmodium falciparum*

Rohextrakte von <i>M. pyrifolia</i> (Ernte 2000)	IC ₅₀ -Werte (µg/ml) ^a nach 42 h		IC ₅₀ -Werte (µg/ml) nach 72 h	
	PoW	Dd2	PoW	Dd2
Oberirdische Pflanzenteile				
Lipophiler Extrakt (PE-EtOAc 1:1)	10,5	13,5	17,7	14,8
Methanolischer Extrakt (MeOH 100 %)	> 50	> 50	> 50	> 50
Wässriger Auszug	> 50	> 50	n.b.	n.b.
Wurzeln				
Lipophiler Extrakt (PE-EtOAc 1:1)	8,3	11,2	n.b.	n.b.
Methanolischer Extrakt (MeOH 100 %)	> 50	> 50	n.b.	n.b.
Wässriger Auszug	> 50	> 50	n.b.	n.b.
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	0,008	0,073	0,004	0,02

^a: getestet als Triplikate, n.b.: nicht bestimmt

Von allen getesteten Rohextrakten zeigten die lipophilen Extrakte der oberirdischen Pflanzenteile und der Wurzeln eine Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum*. Für *M. pyrifolia* konnte somit die antiplasmodiale Aktivität *in vitro* bestätigt werden.

Aus Tabelle 15 ist ersichtlich, dass die Hemmwirkung des lipophilen Extraktes der oberirdischen Pflanzenteile mit IC₅₀-Werten zwischen 10,5 µg/ml (PoW nach 42 Stunden) und 17,7 µg/ml (PoW nach 72 Stunden) in beiden Testansätzen sehr ähnlich war. Die Verlängerung der Expositionsdauer gegenüber dem Parasiten zeigte somit keinen Einfluß auf die Hemmwirkung. Der methanolische Extrakt der oberirdischen Pflanzenteile besaß auch nach 72 Stunden keine Hemmwirkung. Die Inaktivität dieses Extraktes scheint somit nicht mit der Expositionsdauer gegenüber *P. falciparum* in Zusammenhang zu stehen.

Da aus der traditionellen Medizin Westafrikas nur die Verwendung der oberirdischen Pflanzenteile von *M. pyrifolia* bekannt war, wurden ausschließlich deren lipophiler und methanolischer Rohextrakt für den 72-Stunden-Test herangezogen.

Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität der isolierten Verbindungen

Sämtliche aus *M. pyrifolia* isolierten Naturstoffe wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt. In Tabelle 18 sind die IC₅₀-Werte der aktiven Verbindungen wiedergegeben.

Tab. 16:

In-vitro*-Aktivität ausgewählte Verbindungen aus *Microglossa pyrifolia* gegenüber *Plasmodium falciparum

Isolierte Verbindungen aus <i>M. pyrifolia</i>	IC ₅₀ -Werte ^a			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Linolsäure (14) ^b	6,1	21,8	8,7	31,1
6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> -Geranylgeraniol-19-carbonsäure (17)	4,3	13,4	5,2	16,3
2 <i>E</i> -Phytol (18)	2,5	8,4	3,4	11,4
Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (20)	9,0	33,1	> 25	> 92
13-Hydroxy-9 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> -octadecatriensäure (22)	6,7	22,8	13,7	46,6
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	0,008	0,015	0,073	0,14

^a: getestet als Triplikate

^b: Linolsäure wurde aus *Calea tenuifolia* isoliert und getestet. Die hier angegebenen IC₅₀-Werte wurden übernommen (siehe Tab. 10).

Aus Tabelle 16 ist ersichtlich, dass in erster Linie die isolierten aliphatischen Verbindungen aus *M. pyrifolia* eine antiplasmodiale Aktivität aufwiesen. Diese Naturstoffe sollten besonders im lipophilen Rohextrakt angereichert sein, was eine Erklärung für die antiplasmodiale Hemmwirkung des PE–EtOAc–Extrakts (im Gegensatz zum inaktiven methanolischen Extrakt) sein könnte.

2E–Phytol (**18**) besaß die stärkste antiparasitäre Wirkung mit IC₅₀–Werten von 8,4 µM gegenüber PoW und 11,4 µM gegenüber Dd2. Eine ähnliche Hemmwirkung zeigte 6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (**17**) mit IC₅₀–Werten von 13,4 µM [PoW] und 16,3 µM [Dd2]. Wie bereits zuvor ermittelt (siehe Tab.1 10), wies Linolsäure (**14**) ebenfalls eine moderate antiparasitäre Aktivität mit IC₅₀–Werten von 21,8 µM [PoW] und 31,1 µM [Dd2] auf. Die oxidierte Fettsäure 13–Hydroxy–9Z,15Z,11E–octadecatriensäure (**22**) besaß eine moderate Wirkung gegenüber dem Parasiten mit IC₅₀–Werten von 22,8 µM auf PoW und 46,6 µM gegenüber Dd2. Benzyl–2,6–dimethoxybenzoat (**20**) zeigte nur gegenüber dem Chloroquin–sensiblen Stamm PoW eine moderate Hemmung mit einem IC₅₀–Wert von 33,1 µM.

Die aus den oberirdischen Pflanzenteilen isolierten Naturstoffe Umbelliferon (**15**), Sinapyldiangelat (**16**), Acacetin (**21**), 1–Hydroxycalamenen (**23** und **24**) sowie die Furanoditerpene Strictinsäure (**25**), 10α–Nidoresedasäure (**26**), 10β–Nidoresedasäure (**27**) und Hardwickiasäure (**28**) erwiesen sich mit IC₅₀–Werten > 25 µg/ml als inaktiv. Interessanterweise zeigte 1–Acetyl–6E,10E,14E–geranylgeraniol–19–carbonsäure (**29**) keine antiplasmodiale Hemmung im Gegensatz zur strukturell sehr ähnlichen 6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (**17**). Die Verbindung 19–Oxo–6E,10E,14E–geranylgeraniol (**30**) konnte aufgrund der geringen Substanzmenge nicht dem Testsystem zugeführt werden. Da sich 8–Methyl–β–naphthol (**31**) in verschiedenen Lösemitteln als nicht stabil erwies, konnte die *in-vitro*–Testung dieses Naturstoffes ebenfalls nicht durchgeführt werden. Stigmasterol (**19**), das als Hauptkomponente aus der Wurzel von *M. pyrifolia* isoliert wurde, erwies sich als nicht aktiv gegenüber *P. falciparum*. Auch das aus den Wurzeln erhaltene Acetylgemisch, zeigte keine Hemmungswirkung.

Die antiparasitär wirkende 6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (**17**) wurde aus verschiedenen aktiven Fraktionen isoliert. Dies deutet daraufhin, dass Verbindung **17** einer Hauptkomponente von *M. pyrifolia* entspricht. Weiterhin ist zu vermuten, dass **17** für die antiprotozoale Aktivität dieser Heilpflanze verantwortlich ist.

Antiplasmodiale Wirkung der traditionellen Teezubereitung

Um die antiplasmodiale *in-vitro*-Wirkung der traditionellen Teezubereitung der Droge von *M. pyrifolia* bestätigen zu können, wurde aus den oberirdischen Pflanzenteilen ein wässriger Auszug hergestellt. Der Rückstand wurde dem Testsystem zugeführt und erwies sich als inaktiv gegenüber dem Parasiten. Anschließend wurde die gesamte Probenmenge auf einer RP-18-Säule mittels eines MeOH-H₂O-Gradienten abnehmender Polarität, MeOH und CHCl₃ aufgetrennt. Das Eluat wurde in 9 Fraktionen aufgefangen, die auf ihre antiplasmodiale Aktivität untersucht wurden. Die folgenden Fraktionen zeigten gegenüber Dd2 eine moderate Hemmwirkung:

Fraktion 5: IC₅₀-Wert: 24,6 µg/ml,

Fraktion 6: IC₅₀-Wert: 31,7 µg/ml,

Fraktion 7: IC₅₀-Wert: 14,7 µg/ml und

Fraktion 8: IC₅₀-Wert: 24,4 µg/ml.

Mittels ¹H-NMR- und MS-Spektren konnte in Fraktion 5 die Verbindung 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] (**8**) detektiert werden, deren antiplasmodiale Wirkung bereits zuvor bestimmt wurde (IC₅₀-Wert: 43,3 µM [PoW], 33,4 µM [Dd2]) (siehe Kap. 2.4.2.). In Fraktion 6 konnte durch ¹H-NMR- und MS-Messung das Furanoditerpen Strictinsäure (**25**) detektiert werden, das sich zuvor als nicht aktiv erwies. Mit Hilfe der gleichen spektroskopischen Methoden wurde in Fraktion 7 der Naturstoff 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) detektiert, welcher antiplasmodial aktiv war (IC₅₀-Wert: 13,4 µM [PoW], 16,3 µM [Dd2]). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Fraktionierung des antiplasmodial unwirksamen wässrigen Auszuges zu einer Anreicherung der biologischen Aktivität in einzelnen Fraktionen führte. Hiermit konnte nachgewiesen werden, dass auch in der traditionellen Zubereitungsform der Droge, dem wässrigen Auszug, antiplasmodial wirkende Inhaltsstoffe enthalten sind. Die Gesamtheit der erhaltenen *in-vitro*-Daten deuten daraufhin, dass die Verwendung von *M. pyrifolia* in der phytotherapeutischen Malariatherapie auf eine rationale Basis gestellt werden kann.

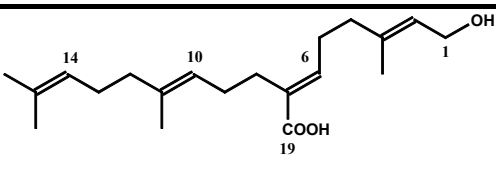
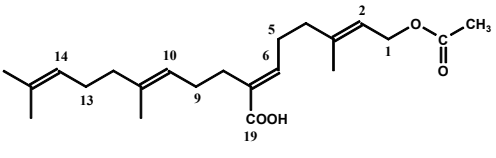
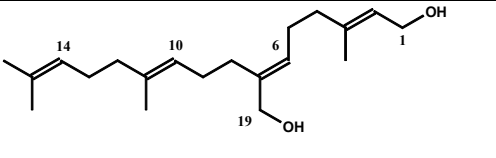
Antiplasmodialer Effekt des Partialsynthetikums 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**32**)

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte festgestellt werden, inwiefern verschiedene Geranylgeraniol-Derivate in Abhängigkeit von ihrem Substitutionsmuster eine unterschiedliche *in-vitro*-Aktivität gegenüber *P. falciparum* besitzen.

Die durch Partialsynthese aus **17** gewonnene Verbindung 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**32**) wurde ebenfalls dem antiplasmodialen Test zugeführt und zeigte mit IC₅₀-Werten von 18,6 µM [PoW] und 52,9 µM [Dd2] eine Hemmwirkung.

Tab. 17:

***In-vitro*-Aktivität der Geranylgeraniol-Derivate **17**, **29** und **32**
gegenüber *Plasmodium falciparum***

Geranylgeraniol-Derivate	IC ₅₀ -Werte ^a			
	PoW		Dd2	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
	4,3 [#]	13,4	5,2 [#]	16,3
6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> -Geranylgeraniol-19-carbonsäure (17)				
	> 50 [#]	> 138	> 50 [#]	> 138
1-Acetyl-6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> -geranylgeraniol-19-carbonsäure (29)				
	5,7	18,6	16,2	52,9
19-Hydroxy-6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> -geranylgeraniol (32)				
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	0,008	0,015	0,073	0,14

^a: getestet als Triplikat

[#]: IC₅₀-Werte aus Tabelle 6 übernommen

Wie aus Tabelle 17 ersichtlich, scheint die antiplasmodiale Aktivität der Geranylgeraniol-Derivate von den Substituenten an Position 1 und 19 abhängig zu sein. Die beiden Verbindungen **17** und **32**, mit einer Hydroxygruppe an Position 1, zeigten eine Hemmung mit den IC₅₀-Werten von 13,4 µM [PoW] und 16,3 µM [Dd2] für **17** und mit den IC₅₀-Werten von 18,6 µM [PoW] und 52,9 µM [Dd2] für **32**. Die unpolarste Verbindung **29** erwies sich als inaktiv.

2.5.7 Weitergehende Untersuchungen mit 6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (17)

Da der Naturstoff 6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (17) aus verschiedenen aktiven Fraktionen von *M. pyrifolia* isoliert werden konnte, und somit vermutlich eine antiplasmodial wirkende Hauptkomponente darstellt, wurden mit 17 weitere Untersuchungen durchgeführt. Ziel dabei war es, nähere Aussagen über das antiparasitäre Wirkprinzip von 17 gegenüber *P. falciparum* treffen zu können.

2.5.7.1 72–Stunden–Test

Im Rahmen dieses Versuches sollte gezeigt werden, ob eine Verlängerung der Testdauer von 42 Stunden auf 72 Stunden einen Einfluß auf die antiplasmodiale Aktivität von 6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (17) ausübt.

Tab. 18:

In-vitro*–Aktivität von 6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (17) gegenüber *Plasmodium falciparum

Testsubstanz	IC ₅₀ –Werte (µM) ^a nach 42 h		IC ₅₀ –Werte (µM) nach 72 h	
	PoW	Dd2	PoW	Dd2
	6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (17)	13,4	16,3	27,4
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	0,008	0,073	0,004	0,02

^a: getestet als Triplikat

Gegenüber Dd2 besaß Verbindung 17 nach 42 Stunden einen IC₅₀–Wert von 16,3 µM. Nach 72 Stunden lag eine ähnlich hohe Hemmwirkung mit einem IC₅₀–Wert von 15,8 µM vor. Gegenüber PoW zeigte 17 nach 42 Stunden ebenfalls eine gute antiplasmodiale Aktivität mit einem IC₅₀–Wert von 13,4 µM. Im 72–Stunden–Test wurde für 6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (17) gegenüber PoW jedoch eine Verringerung der antiparasitären Wirkung beobachtet (IC₅₀–Wert von 27,4 µM). Die Veränderung der Hemmwirkung in Abhängigkeit von der Testdauer wurde nur gegenüber dem Stamm PoW, aber nicht gegenüber dem Klon Dd2 beobachtet. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass es sich hierbei um biologische Schwankungen innerhalb des *in-vitro*–Testsystems handelt,

wie z.B. unterschiedliche Wachstumsraten der Plasmodien am ersten Tag des 72–Stunden–Tests. Die im Rahmen dieses Versuches erhaltenen Daten zeigen, dass eine Verlängerung der Testdauer auf 72 Stunden die antiplasmodiale Aktivität von **17** nicht beeinflusst.

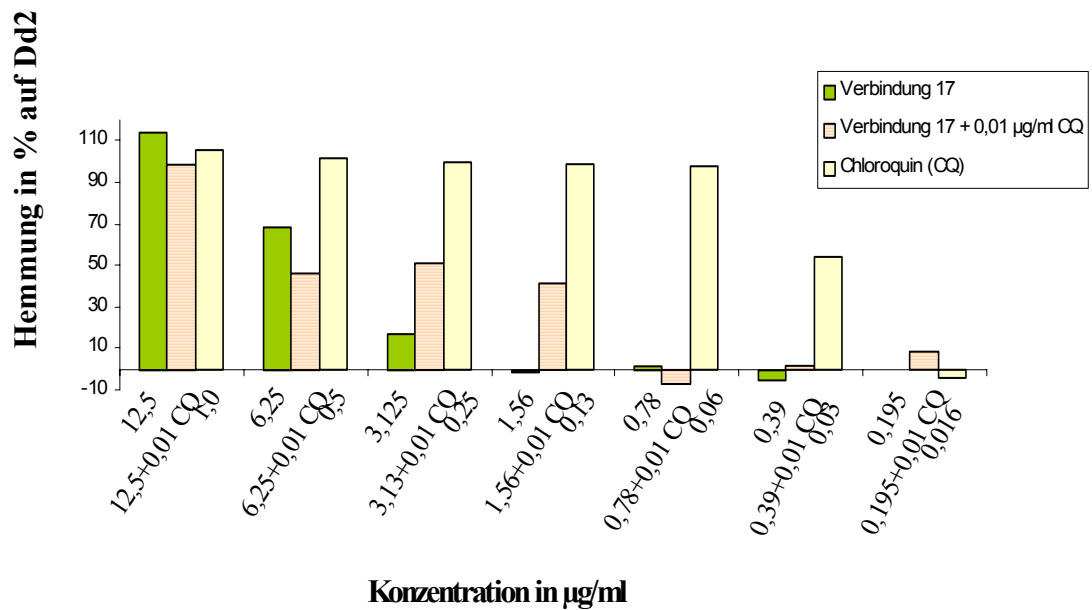
2.5.7.2 Antiplasmodiale Aktivität in Gegenwart von Chloroquin

Aus der Literatur ist der Einfluß von Pflanzeninhaltsstoffen auf die Wirksamkeit von Chloroquin bekannt. Im Rahmen verschiedener Studien wurde hierbei eine Potenzierung der Chloroquin–Aktivität in Gegenwart von Inhaltsstoffen einiger *Strychnos*–Arten beobachtet (Ratsimamanga–Urverg *et al.*, 1992, Rasoanaivo *et al.*, 1994) (siehe auch Kap. 1.1.3.).

Bei der Bewertung einer ethnobotanischen Information muß berücksichtigt werden, dass unter Umständen parallel, wenn auch nicht regelmäßig, zur phytotherapeutischen Behandlung der Malaria die Einnahme eines synthetischen Anti–Malariamittels erfolgt. In Ghana wird in der schulmedizinischen Malariatherapie vorwiegend Chloroquin eingesetzt, da dieses Medikament kostengünstig und auch in ländlichen Gebieten erhältlich ist (Mockenhaupt, 2000).

Diese Beobachtungen gaben den Anlaß zu einer Studie, deren Ziel es war, einen möglichen synergistischen Effekt bzgl. der antiplasmodialen *in-vitro*–Wirkung zwischen einem aktiven Naturstoff und Chloroquin zu untersuchen. Da *M. pyrifolia* in der traditionellen Malariatherapie Ghanas verwendet wird, wurde die isolierte antiplasmodial wirkende 6*E*,10*E*,14*E*–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (**17**) für diesen Versuch ausgewählt.

Zunächst wurden die IC₅₀–Werte von **17** und von Chloroquin x 2 H₃PO₄ bestimmt. Anschließend wurde eine Konzentration ausgewählt, bei der Chloroquin allein nicht mehr wirksam ist (c = 0,01 µg/ml). In einem zweiten Versuch wurde daraufhin der IC₅₀–Wert von **17** bei einer Anfangskonzentration von c₀ = 12,5 µg/ml unter Zugabe von 0,01 µg/ml Chloroquin pro Kavität bestimmt.



Konzentration von 17 [µg/ml]	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39
% Hemmung	114	69	17	-1	2	-5

Konzentration von 17 [µg/ml] + jeweils 0,01 µg/ml Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39
% Hemmung	156	46	51	41	-7	2

Abb. 66:

Antiplasmodiale Aktivität von 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (17) in Gegenwart von Chloroquin

In vorherigen Untersuchungen (siehe Kap. 2.5.6.) wurde für **17** gegenüber Dd2 ein IC₅₀-Wert von 4,5 µg/ml ermittelt. Für Chloroquin lag der IC₅₀-Wert bei 0,03 µg/ml [Dd2]. Aus Abb. 17 ist erkennbar, dass sich in Gegenwart von Chloroquin die antiplasmodiale Hemmwirkung von 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) geringfügig änderte. So war z.B. bei der Konzentration von 3,13 µg/ml der Verbindung **17** unter Zusatz

von 0,01 µg/ml Chloroquin noch eine deutliche Hemmung von 51% zu beobachten. Auch bei der Konzentration von 1,56 µg/ml der Verbindung **17** unter Zusatz von 0,01 µg/ml Chloroquin lag noch eine 41%ige Hemmung vor. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass bei einer Kombination von **17** und 0,01 µg/ml Chloroquin eine 40%ige bis 50%ige Hemmwirkung über einen größeren Konzentrationsbereich gehalten werden konnte, als bei der reinen Verbindung **17**. Offensichtlich verhalten sich 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) und Chloroquin in ihrer jeweiligen *in-vitro*-Aktivität gegenüber *P. falciparum* geringfügig synergistisch. Dieses Phänomen müsste jedoch nochmals mit anderen Konzentrationen von **17** bzw. mit weiteren Inhaltsstoffen überprüft werden.

Diese Daten lassen vermuten, dass auch geringe Konzentrationen von Chloroquin im Blut, die z.B. auf eine vorherige Malariatherapie des Patienten zurückzuführen sind, einen Einfluß auf die antiplasmodiale Aktivität der Arzneipflanze, bzw. auf isolierte Pflanzeninhaltsstoffe ausüben können. Da Chloroquin aus zahlreichen Organen (z.B. Leber, Blutzellen) nur langsam freigesetzt wird, hält seine Wirkung lange an. Die Halbwertszeit des Anti-Malariamittels beträgt ein bis zwei Monate (Mutschler, 1996).

Es sollte somit bei einer ethnobotanischen Studie, die die Evaluierung antiplasmodial wirkender Heilpflanzen zum Ziel hat, beachtet werden, dass die Patienten während bzw. vor der phytotherapeutischen Behandlung kein Chloroquin zu sich nehmen. Dies kann beispielsweise durch Urinproben realisiert werden. Dadurch könnten Pflanzenarten, deren Inhaltsstoffe eine signifikante Hemmung von *P. falciparum* bewirken, leichter evaluiert werden. Es wird jedoch vermutet, dass die antiparasitäre Hemmwirkung von *M. pyrifolia* auf aktive Inhaltsstoffe zurückzuführen ist. Hierfür sprechen der nur geringe beobachtete synergistische Effekt von **17** und Chloroquin.

2.5.8 Zytotoxische Wirkung der isolierten Verbindungen

Von antiplasmodial aktiven Verbindungen aus *M. pyrifolia* sowie dem Partialsynthetikum 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**32**) wurde die zytotoxische Wirkung an der humanen Endothelzelllinie ECV 304 untersucht (siehe Kap. 5.3.1.). Es sollte festgestellt werden, inwiefern die *in-vitro*-Aktivität der Verbindungen **14**, **17**, **20**, **22** und **32** auf eine spezifische Hemmung von *P. falciparum* oder auf eine allgemeine Zelltoxizität zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde der Selektivitätsindex (SI) errechnet. Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte von 2*E*-Phytol (**18**) die zytotoxische Wirkung nicht ermittelt werden.

Tab. 18:

Zytotoxische Wirkung der aus *M. pyrifolia* isolierten Verbindungen 14, 17, 20, 22 sowie des Partialsynthetikums 32 gegenüber der Zelllinie ECV 304

Getestete Verbindungen	IC ₅₀ -Werte (µM) ^a		
	ECV 304	Dd2	SI ^b
Linolsäure (14) ^c	27,2	31,1	0,9
6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> -Geranylgeraniol-19-carbonsäure (17)	95,6	16,3	5,9
Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (20)	200,2	33,1 [#]	> 1,8
13-Hydroxy-9 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> -octadecatriensäure (22)	> 680	46,6	> 14,6
19-Hydroxy-6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> -geranylgeraniol (32)	143,7	52,9	2,7
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄	57,5	0,14	411,0

^a: Zahl der Experimente: 8 (ECV 304), 3 [Dd2]

^b: Selektivitätsindex (SI) ist definiert als Quotient aus der zytotoxischen und der antiplasmodialen Aktivität

^c: Linolsäure wurde zuvor aus *Calea tenuifolia* isoliert und getestet. Die hier angegebenen IC₅₀-Werte wurden übernommen (siehe Tabelle 10).

[#]: PoW

Die oxidierte Fettsäure 13-Hydroxy-9*Z*,15*Z*,11*E*-octadecatriensäure (22) zeigte mit einem IC₅₀-Wert > 680 µM keinen zytotoxischen Effekt gegenüber der humanen Endothelzelllinie ECV 304. Die Verbindung zeigte eine vierzehnfach höhere antiparasitäre Wirkung mit einem IC₅₀-Wert von 46,6 µM gegenüber Dd2. Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (20) besaß eine geringfügige Zytotoxizität (IC₅₀-Wert: 200,2 µM) bei einer etwa sechsfach höheren antiplasmodialen Aktivität (IC₅₀-Wert von 33,1 µM gegenüber PoW). Das Partialsynthetikum 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (32) erwies sich auch als gering zytotoxisch (IC₅₀-Wert: 143,7 µM). Die Verbindung zeigte eine etwa dreifach stärkere Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten (IC₅₀-Wert: 52,9 µM gegenüber Dd2). Die in *M. pyrifolia* stark angereicherte Verbindung 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (17) besaß eine moderate zytotoxische Wirkung gegenüber Zelllinie ECV 304 (IC₅₀-Wert: 95,6 µM). Die antiplasmodiale Aktivität war mit einem IC₅₀-Wert von 16,3 µM gegenüber Dd2 um das sechsfache höher. Linolsäure (14) erwies sich als stark zytotoxisch (IC₅₀-Wert: 27,2 µM, siehe Tabelle 10). Wie bereits in Kapitel 2.4.2. erwähnt, sollte bei Linolsäure berücksichtigt werden, dass diese Fettsäure in vielen Produkten der täglichen Nahrung enthalten ist. Insofern müssen zur genauen Bewertung der Zytotoxizität der Verbindung weitere Daten herangezogen werden.

Allgemein muß beachtet werden, dass auf der Grundlage dieses einen *in-vitro*-Tests, ohne das Vorliegen von *in-vivo*-Daten, der zytotoxische Effekt der Verbindungen nur teilweise bewertet werden kann. Die erhaltenen *in-vitro*-Daten der Rohextrakte von *M. pyrifolia* und daraus isolierter Verbindungen lassen jedoch vermuten, dass die Droge eine moderate antiplasmodiale Hemmwirkung besitzt bei gleichzeitiger moderater bis geringfügiger Zytotoxizität der aktiven Verbindung. Inwiefern die traditionelle Heilpflanze für eine uneingeschränkte bzw. langfristige Anwendung in der phytotherapeutischen Malariatherapie geeignet ist, kann im Rahmender vorliegenden Studie nicht beurteilt werden.

2.6 Berechnung des log P-Wertes und log D-Wertes

2.6.1 Der log P-Wert als pharmakodynamisches Merkmal

Um biologisch aktive Verbindungen evaluieren zu können, die als zukünftige Arzneistoffe von Bedeutung sein könnten, sind Aussagen über die pharmakokinetischen Eigenschaften der Stoffe notwendig. Um an seinen Wirkungsort im Körper gelangen zu können, muß der Stoff verschiedene Biomembranen passieren. Die Hauptbestandteile dieser Membranen sind Phospholipide, Cholesterol, Sphingolipide und Glycolipide. Aufgrund der amphiphilen Natur der Biomembranen muß ein Wirkstoff sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften besitzen. Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (P) ist eine physikalische Größe, mittels der die lipophilen und hydrophilen Eigenschaften eines Stoffes beschrieben werden können. Der Verteilungskoeffizient P ist definiert als der Quotient aus der Konzentration des unionisierten Stoffes in *n*-Octanol sowie in Wasser.

$$\frac{\text{Konzentration des unionisierten Stoffes in } n\text{-Octanol}}{\text{Konzentration des unionisierten Stoffes in Wasser}} = \text{Verteilungskoeffizient P}$$

Aufgrund ähnlicher Strukturmerkmale (gesättigte Alkylketten oder Hydroxylgruppen, die entweder Donor- oder Akzeptorfunktionen übernehmen kann) sind die Stoffeigenschaften in *n*-Octanol mit den Eigenschaften einiger Stoffe in den Biomembranen vergleichbar (Panchagmula *et al.*, 2000). Üblicherweise erfolgt die logarithmische Angabe als log P-Wert. Prinzipiell entsprechen log P-Werte zwischen 0 und 3 einer optimalen passiven Stoffabsorption. Bei einem log P-Wert kleiner 0 ist der Stoff zu hydrophil, selbst wenn er

durch eine gute Löslichkeit charakterisiert ist, wird die Permeabilität des Stoffes nur gering sein. Verbindungen, die einen log P-Wert besitzen der wesentlich größer ist als 3 sind sehr lipophil, d.h. sie werden gut absorbiert, jedoch auch schnell metabolisiert (Toon *et al.*, 1983). Eine weitere Richtlinie für die Evaluierung von Stoffen mit guten pharmakodynamischen Eigenschaften stellten Lipinsky und Mitarbeiter auf, die in der Literatur oftmals als "rule of five" bezeichnet wird. Demnach ist ein Stoff mit geringer Absorption bzw. schwachem Permeationsvermögen wie folgt gekennzeichnet (Lipinsky *et al.*, 1997):

- log P-Wert > 5
- Molmasse > 500
- Anzahl der Atome mit Akzeptoreigenschaften, die in der Lage sind Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden (O- und N-Atome) > 10
- Anzahl der funktionellen Gruppen mit Donoreigenschaften, die in der Lage sind Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden (OH- und NH-Gruppen) > 5

Für ionisierbare Verbindungen, die beim physiologischen pH von 7,4 dissoziiert vorliegen, wird der log D-Wert angegeben. Hierbei ist der Verteilungskoeffizient D definiert als der Quotient aus der Konzentration des undissoziierten Stoffes in der organischen Phase und der Konzentration des dissoziierten Stoffes in der wässrigen Phase (Panchagmula *et al.*, 2000). Stoffe mit einem log D-Wert zwischen 0 und 3 besitzen ein hohes Membranpermeationsvermögen. Verbindungen mit einer geringen Permeation sind durch log D-Werte < 1,5 oder log D-Werte > 4,5 charakterisiert (Krämer, 1999).

Bei der Bewertung von log P- bzw. log D-Werten ist zu beachten, dass diese Daten nur zu einem bestimmten Teil Aussagen bzgl. der Wirkstoffresorption zulassen. Beispiele für weitere wichtige Einflußfaktoren stellen die Löslichkeit und Molmasse der Verbindung sowie die Beachtung der "rule of five" dar.

2.6.2 Log P- und log D-Wert-Berechnung isolierter Verbindungen aus *E. mexicanum*, *C. tenuifolia* und *M. pyrifolia*

Im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen an den bearbeiteten Drogen *E. mexicanum*, *C. tenuifolia* und *M. pyrifolia* wurden mittels Computerkalkulationen log P-Wert- bzw. log D-Wertbestimmungen durchgeführt.

Aufgrund der geringen Substanzmengen der isolierten Verbindungen aus den drei Pflanzenarten war die experimentelle Bestimmung des log P-Wertes, z.B. durch HPLC,

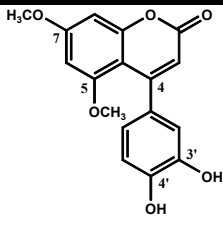
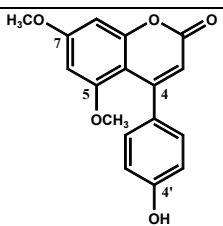
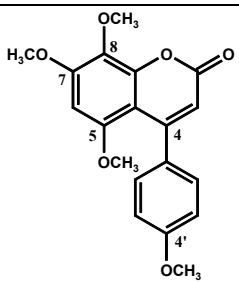
nicht möglich. Da die folgenden log P–Werte und log D–Werte nur berechnet wurden, können diese Daten nur ein Indiz für die experimentell bestimmbaren Werte sein. Alle log P–Werte und log D–Werte wurden mit Hilfe der Software "log P–Suite[®] ACD" erstellt. Die ACD–Berechnungen berücksichtigen sowohl den Einfluß von separaten Atomen (z.B. O–Atom, N–Atom) und Strukturfragmenten (OH–Gruppen, NH–Gruppen), als auch von intramolekularen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Fragmenten (Krämer, 1999).

Log P–Berechnung für die isolierten Phenylcumarine aus *E. mexicanum*

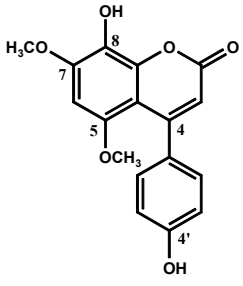
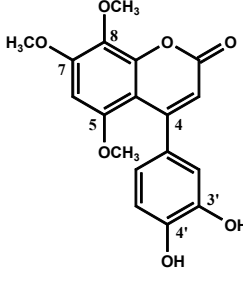
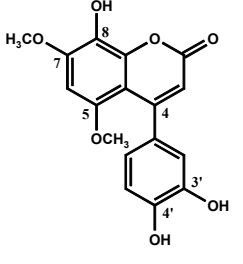
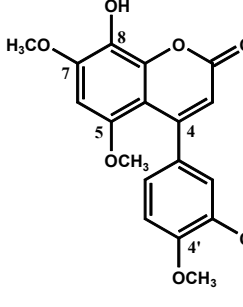
Da alle isolierten Phenylcumarine bei einem pH von 7,4 undissoziiert vorliegen, ist der log D–Wert gleich dem log P–Wert.

Tab. 19:

Log P–Wertberechnung mittels log P–Suite[®] ACD für die isolierten Phenylcumarine aus *Exostema mexicanum*

Molekülstrukturen der Phenylcumarine	log P–Wert
	3,9
3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (1)	
	3,9
4'-Hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (2)	
	3,4
4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin (3)	

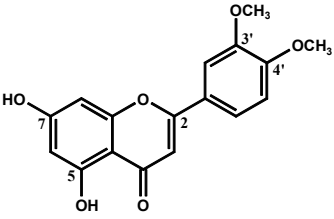
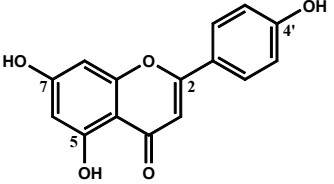
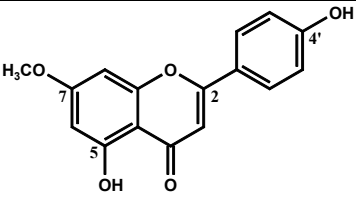
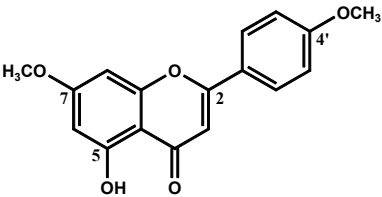
Tab.19: Fortsetzung

Molekülstrukturen der Phenylcumarine	log P-Wert
	3,3
4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (4)	
	3,5
3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcumarin (5)	
	3,3
3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (6)	
	3,5
3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (7)	

Wie aus Tabelle 19 zu erkennen, lagen die log P-Werte aller isolierten Verbindungen aus *E. mexicanum* zwischen 3,3 und 3,9. Die Daten können demnach als Nachweis für moderate bis gute Absorptions- bzw. Membranpermeationseigenschaften dienen.

Log P– Berechnung für isolierte Flavone aus *C. tenuifolia***Tab. 22:**

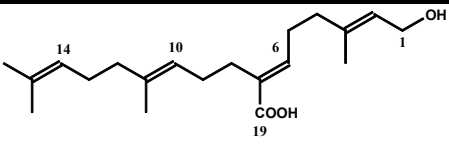
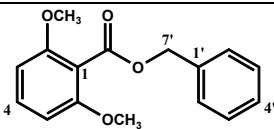
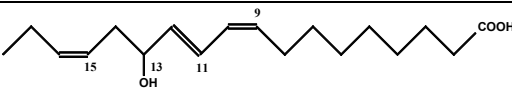
Log P–Wertberechnung mittels log P–Suite[®] ACD für isolierte Flavone aus *Calea tenuifolia*

Molekülstrukturen der Flavone	Log P–Wert
	3,5
5,7–Dihydroxy–3',4'–dimethoxyflavon (8)	
	3,7
4',5,7– Trihydroxyflavon (9)	
	4,1
4',5–Dihydroxy–7–methoxyflavon (10)	
	4,1
5–Hydroxy–4',7–dimethoxyflavon (12)	

Die berechneten Log P–Werte für die isolierten Flavone **8–10** und **12** lagen ebenfalls in einem Bereich zwischen 3,5 und 4,1. Die erhaltenen Daten können als ein Hinweis auf ein gutes Permeationsvermögen der Verbindungen angesehen werden.

Log P- und log D-Berechnung isolierter Verbindungen aus *M. pyrifolia***Tab. 21:**

**Log P- und Log D-Wertberechnung mittels log P-Suite[®] ACD
für isolierte Verbindungen aus *Microglossa pyrifolia***

Molekülstrukturen der Verbindungen	Log P-Wert	log D-Wert ^a
	6,0	3,8
6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> -Geranylgeraniol-19-carbonsäure (17)		
	3,3	3,3
Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (20)		
	5,2	3,0
13-Hydroxy-9 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> -octadecatriensäure (22)		

^a: berechnet bei pH 7,0

Für die Verbindungen **17** und **22** ist zu erwarten, dass sie beim physiologischen pH-Wert von 7,4 dissoziiert vorliegen. Infolgedessen sind hier die log D-Werte aussagekräftiger. Für die isolierten Verbindungen **17**, **20** und **22** lagen die berechneten Log P- und Log D-Werte zwischen 3,0 und 6,0. Somit lassen auch diese Daten auf gute bis moderate Absorptionseigenschaften bei einem physiologischen pH-Wert schließen.

2.7 Untersuchung weiterer Pflanzenextrakte

2.7.1 *Hymenodictyon floribundum* (HOCHST. & STEND.) B. L. ROB. (Rubiaceae)

Die Wurzeln von *Hymenodictyon floribundum* (syn.: *Kurria floribundum*) werden in der traditionellen Medizin Zimbabwes gegen Malaria eingesetzt (Mavi, 1997). Mehrere

ethnomedizinische Verwendungen von *H. floribundum* sind aus Malawi und dem Gebiet des Tanganjika–Sees bekannt (Irvine, 1961, Watt *et al.*, 1962). Aus der Zweigrinde wurden verschiedene Cumarine und Alkaloide, u.a. Berberin, isoliert (Campos–Neves *et al.*, 1966). Um das antiplasmodiale Wirkprinzip von *H. floribundum* charakterisieren zu können, wurde diese Heilpflanze für eingehendere phytochemische Untersuchungen ausgewählt (siehe Kap. 5.13.1.).

Aus den Wurzeln der Pflanzenart wurde durch Kaltextraktion ein methanolischer Rohextrakt gewonnen, der über eine offene Kieselgelsäule fraktioniert wurde. Die Säule wurde mit Cyclohexan, EtOAc und MeOH in dieser Reihenfolge eluiert. Die erhaltenen Fraktionen (Cyclohexan–, EtOAc–, und MeOH–Fraktion) wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt und erwiesen sich als nicht aktiv. Aus diesem Grund wurde die phytochemische Untersuchung von *H. floribundum* nicht weiter fortgeführt.

2.7.2 *Iresine calea* (IBÁÑEZ) STANDL. (Amaranthaceae)

In Mexiko wird ein Dekokt von *Iresine calea* gegen Fieber eingesetzt. Ein Blattdekokt aus 50 g Blättern in 300 g Wasser wird gegen Malaria verabreicht (Morton, 1981). Aus *I. calea* wurden verschiedene Steroide und Terpenoide isoliert (Crabbe *et al.*, 1961). Aufgrund der antiplasmodialen Aktivität des lipophilen Rohextrakts der Blattdroge (siehe Kap. 2.1.) wurde die Heilpflanze für eingehendere phytochemische Untersuchungen ausgewählt.

Aus den Blättern, Blüten und der Zweigrinde von *I. calea* wurden jeweils ein lipophiler, ein methanolischer und ein wässriger Rohextrakt hergestellt. Mit Ausnahme des lipophilen Rohextraktes der Blätter (IC₅₀–Werte: 5,8 µg/ml [PoW], 8,2 µg/ml [Dd2]), erwiesen sich die Extrakte aller Pflanzenteile als nicht aktiv gegenüber dem Parasiten. Der lipophile Blattrohextrakt wurde an einer RP–18–Säule weiter aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wiesen keine antiplasmodiale Aktivität auf. Aus diesem Grund wurde von weiteren Fraktionierungen Abstand genommen.

2.7.3 *Crotalaria laburnifolia* L. (Fabaceae)

In Uganda werden die Blüten von *Crotalaria laburnifolia* in der Malariatherapie eingesetzt (Onegi, 1999). Weiterhin ist aus Ostafrika die Verwendung der Blätter bei Schlangenbissen bekannt. Die Wurzeln werden bei der Behandlung von Gonorrhoe eingesetzt (Kokwaro, 1976). Aus Trinidad wird über die Verwendung eines Wurzeldekokts

von *C. incana* L. gegen Gelbfieber berichtet (Morton, 1981). Aus den Samen von *C. laburnifolia* gelang die Isolierung verschiedener Pyrrolizidinalkaloide, wie z.B. Crotalaburnin. Aus den Blüten und Blättern wurden neben Alkaloiden mehrere Flavonoide, speziell Quercetin- und Luteolinglykoside, isoliert (Subramaniam *et al.*, 1968). Um das antiplasmodiale Wirkprinzip dieser Heilpflanze charakterisieren zu können, wurde *C. laburnifolia* für eingehendere phytochemische Untersuchungen ausgewählt (siehe Kap. 5.13.3.).

Aus den Blättern und Blüten der Pflanze wurden jeweils ein lipophiler, ein methanolischer und ein wässriger Rohextrakt hergestellt. Proben aller erhaltenen Rohextrakte wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt und erwiesen sich als inaktiv. Aus diesem Grund wurden keine Fraktionierungen dieser Drogenextrakte durchgeführt. Nach dem Entfetten der Samen wurde der erhaltene Rückstand in MeOH aufgenommen. Da aus vorherigen phytochemischen Untersuchungen bekannt war, dass in den Samen von *C. laburnifolia* Pyrrolizidinalkaloide enthalten sind, erfolgte die Aufarbeitung des methanolischen Samenextraktes im Sinne einer Alkaloid-Isolierung. Hierzu wurde der methanolische Extrakt auf einen pH von 2 angesäuert und mit CHCl_3 ausgeschüttelt. Zur Gewinnung der Basenfraktion wurde die wässrige Phase auf einen pH von 9–10 eingestellt und mit CHCl_3 ausgeschüttelt. Um enthaltene quartäre Alkaloide anreichern zu können, wurde die wässrige Phase anschließend mit *n*-Butanol ausgeschüttelt. Proben der beiden erhaltenen CHCl_3 -Phasen, der butanolischen und der wässrigen Phase wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt und erwiesen sich als nicht aktiv. Aus diesem Grund wurde von weiteren phytochemischen Untersuchungen Abstand genommen.

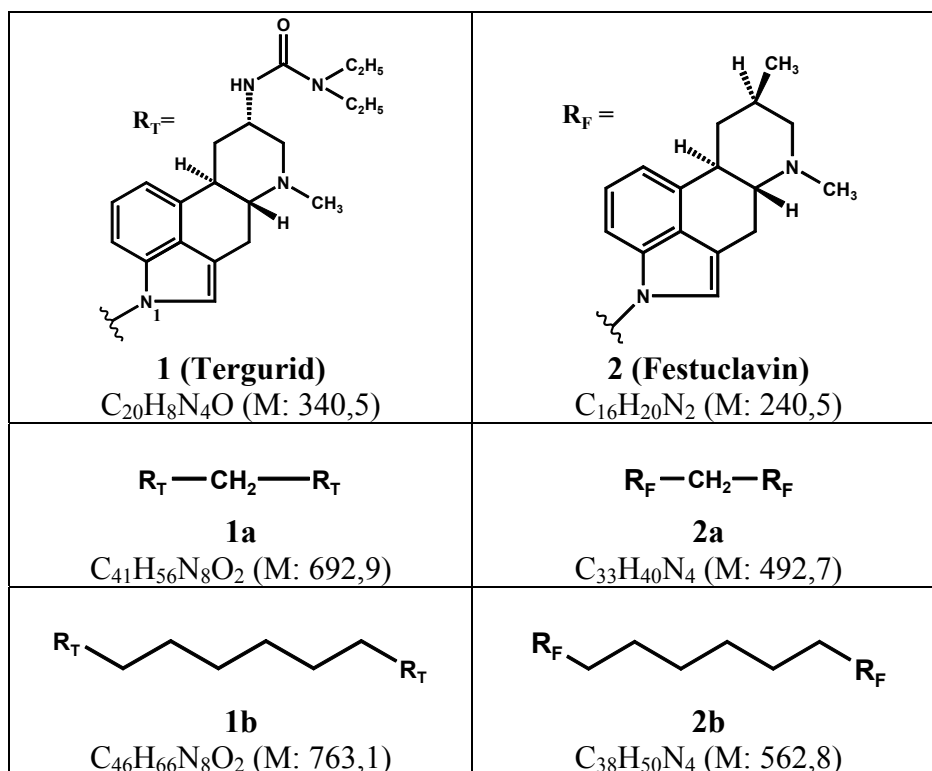
2.8 Untersuchung von monomeren Ergolinen und ihren semi-synthetischen *N*, *N'*-verknüpften oligomeren Derivaten

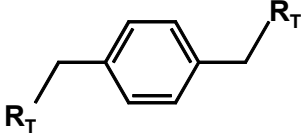
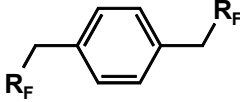
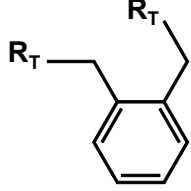
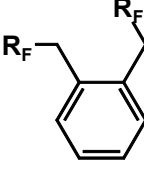
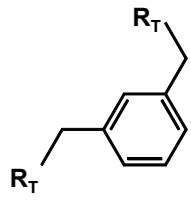
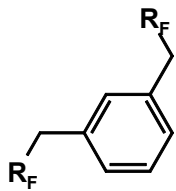
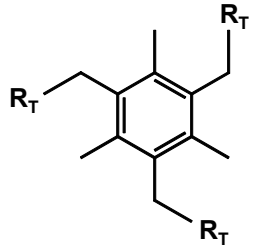
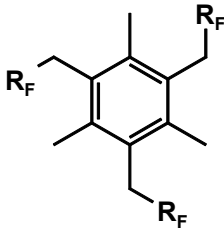
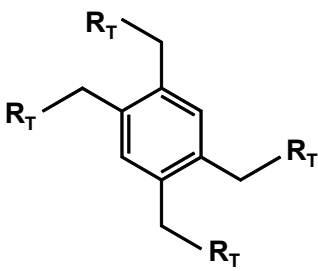
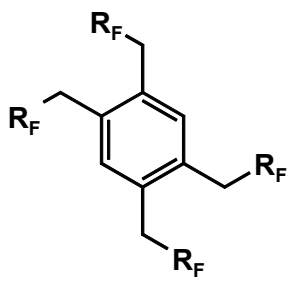
In früheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Festuclavin und verschiedene semi-synthetische Festuclavinderivate eine Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* besitzen (Köhler *et al.*, 2000). Jedoch wiesen diese Verbindungen auch eine erhebliche zytotoxische Wirkung auf (Eich *et al.*, 1986). Im Rahmen der aktuellen Untersuchung sollte ermittelt werden, inwieweit eine Oligomerisierung von Ergolinderivaten zu einer Erhöhung der antiplasmodialen Aktivität führt. Hierbei wurde die Evaluierung solcher Verbindungen angestrebt, bei denen die erhöhte Wirkung gegenüber *P. falciparum* mit einer verminderten Zytotoxizität einhergeht. Die Numerierung der Verbindungen wurde wie folgt durchgeführt:

- Tergurid (**1**) und entsprechende Terguriddimere **1a–1h**,
- Festuclavin (**2**) und entsprechende Festuclavindimere **2a–2h**,
- Pergolid (**3**) und das Pergoliddimere **3c** sowie die Depropylpergoliddimere **3i–3k**.

Diese Numerierung ist unabhängig von der Numerierung der isolierten Inhaltsstoffe aus *E. mexicanum*, *C. tenuifolia* und *M. pyrifolia*.

Im Arbeitskreis von Prof. Dr. V. Křen wurden verschiedene oligomere Ergolinderivate, ausgehend von Tergurid (**1**), Festuclavin (**2**) und Pergolid (**3**) synthetisiert. Mit Tergurid und Festuclavin als Monomere wurden *N*-1,*N*-1'-substituierte Dimere (**1a–1e**, **2a–2e**), sowie jeweils ein Trimer (**1f**, **2f**), ein Tetramer (**1g**, **2g**) und ein Hexamer (**1h**, **2h**) hergestellt. Mit dem Monomer Pergolid wurde ein *N*-1,*N*-1'-verknüpftes Dimer (**3c**) synthetisiert. Zusätzlich wurden zwei *N*-6,*N*-6'-substituierte Dimere (**3i**, **3j**) und ein *N*-1,*N*-6'-verknüpftes Dimer (**3k**) mit Depropylpergolid als Monomer synthetisiert. Hierzu wurden als Linkermoleküle bifunktionale Alkylbromide, wie z.B. 1,6-Dibromhexan, *ortho*-, *para*- und *meta*- Bis(bromomethyl)benzen und 1,3,5-Trimethyl-2,4,6-tris(bromomethyl)benzen eingesetzt. Die erhaltenen Verbindungen wurden auf ihre antiplasmodiale und zytotoxische *in-vitro*-Wirkung hin untersucht. In Abbildung 67 sind die Strukturen der getesteten Verbindungen wiedergegeben.



 <p>1c C₄₈H₆₂N₈O₂ (M: 783,1)</p>	 <p>2c C₄₀H₄₆N₄ (M: 582,8)</p>
 <p>1d C₄₈H₆₂N₈O₂ (M: 783,1)</p>	 <p>2d C₄₀H₄₆N₄ (M: 582,8)</p>
 <p>1e C₄₈H₆₂N₈O₂ (M: 783,1)</p>	 <p>2e C₄₀H₄₆N₄ (M: 582,8)</p>
 <p>1f C₉₀H₁₁₈N₁₆O₄ (M: 1488,0)</p>	 <p>2f C₇₄H₈₆N₈ (M: 1087,5)</p>
 <p>1g C₁₃₂H₁₇₄N₂₄O₆ (M: 2193,0)</p>	 <p>2g C₁₀₈H₁₂₆N₁₂ (M: 1592,3)</p>

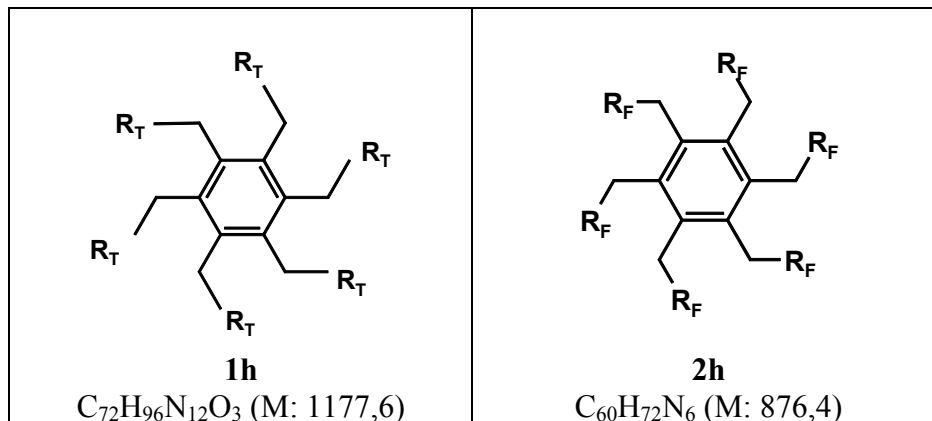
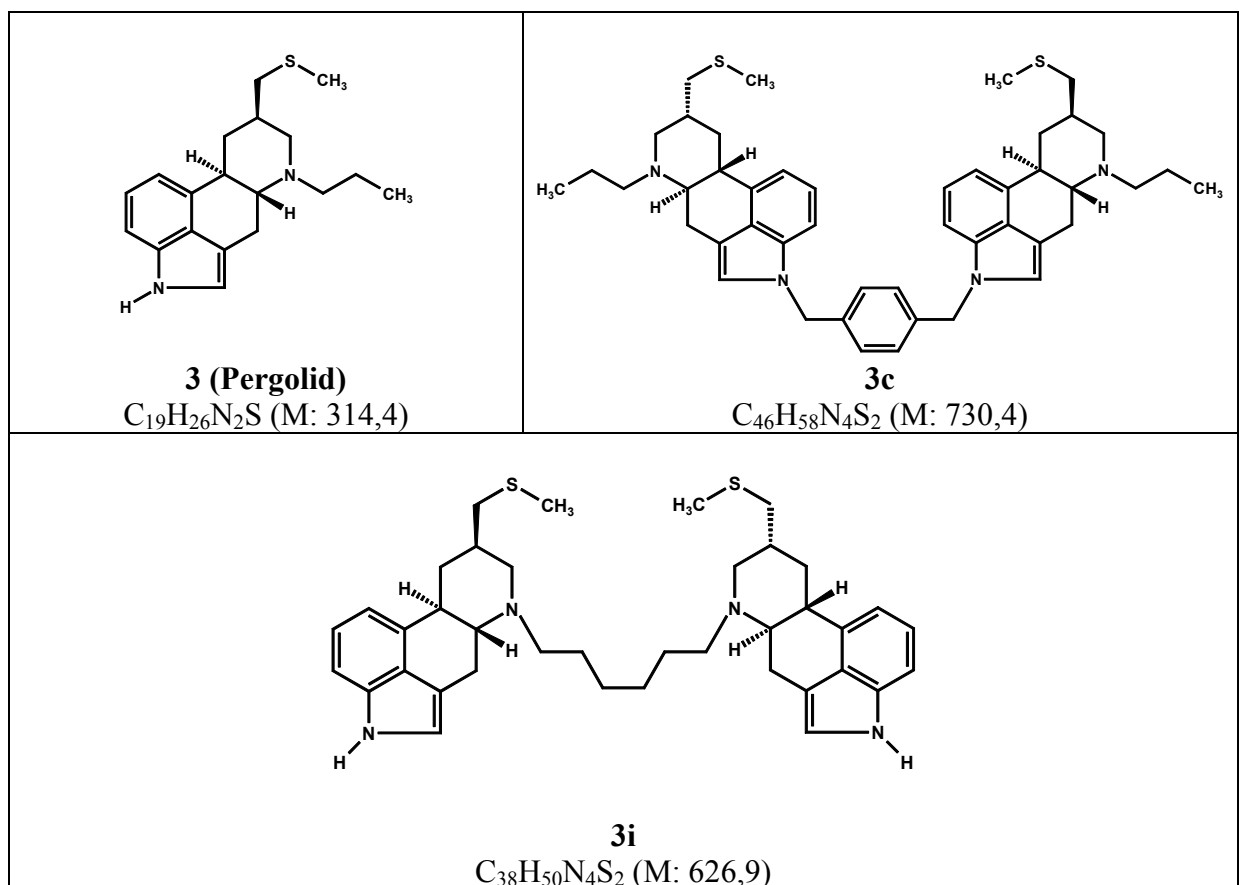
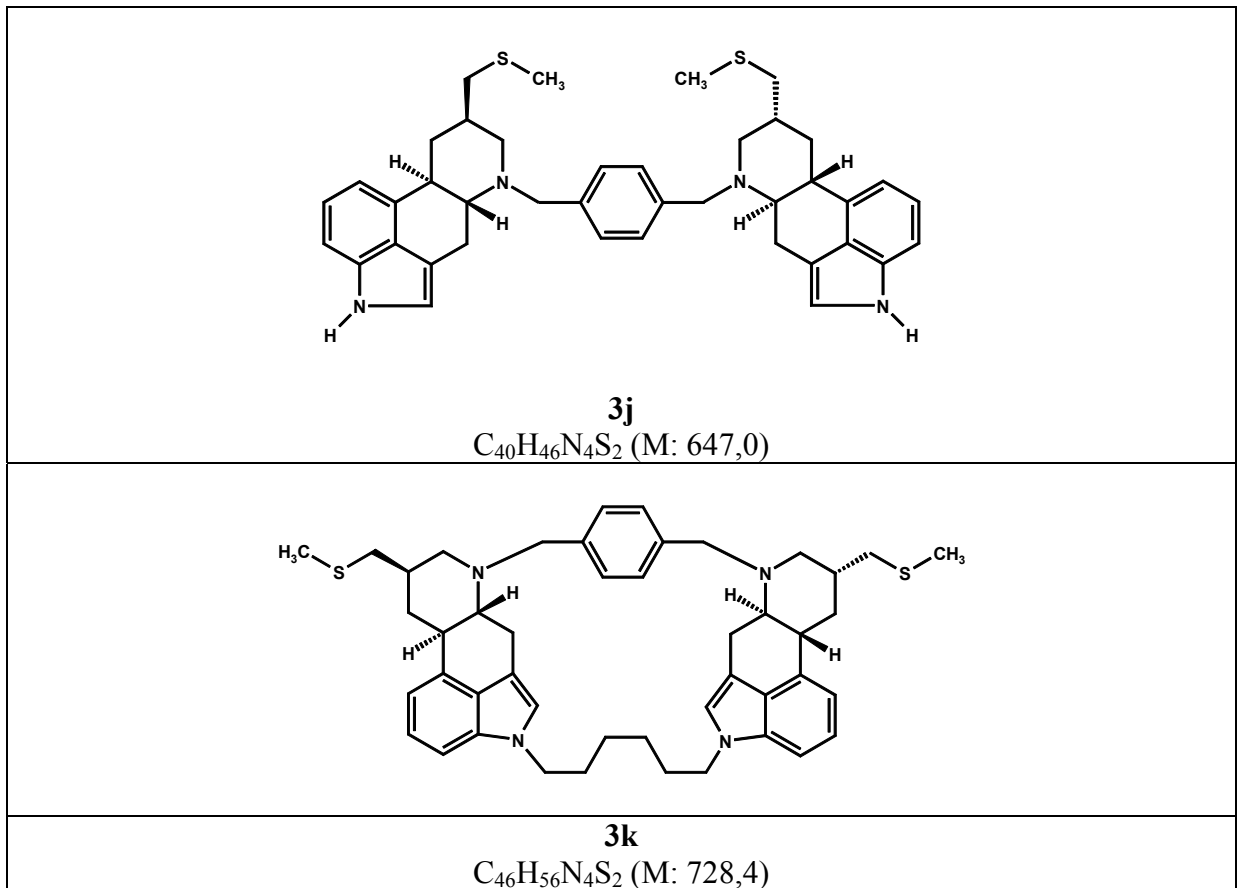


Abb. 67:

Molekülstrukturen der *N*-1,*N*-1'-verknüpften Ergolinoligomere mit Tergurid und Festuclavin als Monomer



**Abb. 68:**

Molekülstrukturen des Pergoliddimers 3c und der Depropylpergoliddimere 3i–3k

2.8.1 Antiplasmodiale Aktivität gegenüber *P. falciparum*

In Tabelle 22 sind die IC₅₀-Werte sowie die Standardabweichungen der getesteten Ergolinderivate wiedergegeben. Bei den getesteten Verbindungen wurde die antiplasmodiale Wirkung wie folgt bewertet:

IC ₅₀ -Wert ≤ 0,2 μM:	sehr gute Aktivität
IC ₅₀ -Wert ≤ 1,0 μM:	gute Aktivität
IC ₅₀ -Wert ≤ 15,0 μM:	moderate bis geringfügige Hemmwirkung
IC ₅₀ -Wert ≥ 15,0 μM:	nicht aktiv

Die zwei Monomere **2** und **3** zeigten nur eine geringe antiplasmodiale Wirkung mit IC₅₀-Werten im Bereich von 8,80 μM [PoW] bis 14,90 μM [Dd2]. Das Monomer **1** erwies sich als nicht aktiv. Die Dimerisierung der einzelnen Monomere führte jedoch zu einer Erhöhung der antiparasitären Wirkung. Die erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass ein kurzer aliphatischer Linker wie beim Terguriddimer **1a** oder beim Festuclavindimer **2a**

zu Verbindungen mit einer moderaten Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten führen mit IC_{50} -Werten zwischen $0,95 \mu\text{M}$ [Dd2] und $3,90 \mu\text{M}$ [PoW]. Dagegen scheint ein aliphatischer Linker mit sechs C-Atomen oder ein aromatischer Linker, der zu einem vergleichbaren Ligandenabstand führt (z.B. bei **1b** oder **2b**), eine Erhöhung der antiplasmodialen Aktivität der Ergolinoligomere zu bewirken. So besaßen die *N*-1,*N*'-1'-verknüpften Dimere **1b**, **1c**, **2b** und **2c** sowie das Trimer **2f** eine gute Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten mit IC_{50} -Werten zwischen $0,43 \mu\text{M}$ [PoW] und $0,75 \mu\text{M}$ [PoW]. Jedoch war zu beobachten, dass sich ab einer bestimmten Ligandenanzahl, wie z.B. bei dem Terguridhexamer **1h**, die Aktivität wieder verringerte. Die Molekülstruktur des Hexamers ist möglicherweise zu voluminös, um den Wirkort erreichen zu können. Zusätzlich wurde von vier Dimeren (**3c**, **3i**–**3k**), mit Pergolid bzw. Depropylpergolid als Monomer, die Hemmwirkung ermittelt. Hierbei zeigte das *N*-6,*N*'-6'-verknüpfte Dimer (**3i**) die höchste Aktivität gegenüber *P. falciparum* mit IC_{50} -Werten von $0,14 \mu\text{M}$ [PoW] und $0,13 \mu\text{M}$ [Dd2].

Tab. 22:

***In-vitro*-Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum* von *N,N'*-verknüpften Ergolinoligomeren im Vergleich zu ihren Monomeren Tergurid, Festuclavin und Pergolid**

Verbindung		<i>In-vitro</i> -Aktivität	
		IC_{50} -Wert ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) ^a	
		poW	Dd2
Monomer Tergurid	1	$25,55 \pm 12,84$	$30,45 \pm 24,75$
Dimer	1a	$3,90 \pm 1,13$	$3,52 \pm 1,19$
	1b	$0,43 \pm 0,92$	$0,45 \pm 0,11$
	1c	$0,51 \pm 0,07$	$0,54 \pm 0,08$
	1d	$1,98 \pm 0,33$	$0,73 \pm 0,28$
	1e	$5,72 \pm 3,26$	$4,16 \pm 2,82$
Trimer	1f	$1,18 \pm 1,00$	$3,29 \pm 1,87$
Tetramer	1g	$0,84 \pm 0,60$	$1,53 \pm 1,37$
Hexamer	1h	$14,90 \pm 3,70$	$7,91 \pm 2,50$
Monomer Festuclavin	2	$8,80 \pm 6,98$	$14,90 \pm 9,74$
Dimer	2a	$1,89 \pm 0,97$	$0,95 \pm 0,23$

Tab. 22: Fortsetzung

Verbindung		<i>In-vitro</i> -Aktivität IC ₅₀ -Wert (μM ± SD) ^a	
		poW	Dd2
	2b	0,67 ± 0,30	0,49 ± 0,23
	2c	0,57 ± 0,47	0,46 ± 0,11
	2d	1,59 ± 1,26	1,31 ± 1,35
	2e	1,10 ± 0,78	0,84 ± 0,51
Trimer	2f	0,75 ± 0,86	0,54 ± 0,42
Tetramer	2g	1,64 ± 1,19	0,72 ± 0,12
Hexamer	2h	2,65 ± 0,88	2,19 ± 0,55
Monomer Pergolid	3	14,15 ± 5,61	9,11 ± 3,22
Dimer	3c	1,57 ± 0,29	1,69 ± 0,74
<i>N</i> -6, <i>N</i> -6'-Depropyl- pergoliddimer	3i	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,03
	3j	1,50 ± 0,13	1,21 ± 0,21
	3k	7,09 ± 1,96	9,75 ± 2,13
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄		0,01 ± 0,002	0,07 ± 0,012

^a: getestet als Triplikat in drei unabhängigen Experimenten

2.8.2 Zytotoxische Wirkung an Fibroblasten NIH 3T3

Um die *N,N*-verknüpften Ergolinoligomere evaluieren zu können, die als potente Anti-Malariamittel relevant wären, wurde zusätzlich der zytotoxische Effekt der Verbindungen an der murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 bestimmt. Die Auswertung des *in-vitro*-Zellwachstums erfolgte mit Hilfe des MTT-Tests.

Tab. 23:

Zytotoxische Wirkung von *N,N'*-verknüpften Ergolinoligomeren im Vergleich zu ihren Monomeren Tergurid, Festuclavin und Pergolid gegenüber murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3

Verbindung		<i>In-vitro</i> -Zytotoxizität IC ₅₀ -Wert (μM ± SD) ^a
Monomer		
Tergurid	1	50,1 ± 1,8
Dimer	1a	98,2 ± 2,3
	1b	2,2 ± 0,8
	1c	25,3 ± 1,8
	1d	45,3 ± 2,7
	1e	15,7 ± 0,9
Trimer	1h	> 100
Tetramer	1f	> 100
Hexamer	1g	> 100
Monomer		
Festuclavin	2	> 100
Dimer	2a	1,5 ± 0,1
	2b	0,5 ± 0,1
	2c	0,2 ± 0,1
	2d	1,2 ± 0,1
	2e	1,8 ± 0,1
Trimer	2h	> 100
Tetramer	2f	n.b.
Hexamer	2g	> 100

Tab. 23: Fortsetzung

Verbindung		<i>In-vitro</i> -Zytotoxizität IC ₅₀ -Wert (μM ± SD) ^a
Monomer		
Pergolid	3	> 100
Dimer	3c	2,5 ± 0,1
<i>N</i> -6, <i>N</i> -6'-Depropyl- pergoliddimer	3i	0,1 ± 0,1
	3j	2,7 ± 0,17
	3k	> 100
Chloroquin x 2 H ₃ PO ₄		67,2 ± 2,3

^a: Zahl der Experimente: 8
n.b.: nicht bestimmt

Das *N*-6,*N*-6'-substituierte Dimer **3i**, welches die höchste antiplasmodiale Aktivität zeigte (IC₅₀-Wert: 0,14 μM [PoW], 0,13 μM [Dd2]), erwies sich gegenüber der Zelllinie NIH 3T3 als stark zytotoxisch (IC₅₀-Wert: 0,1 μM). Eine hohe zytotoxische Aktivität zeigten auch die *N,N'*-verknüpften Ergolinoligomeren **1b**, **2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **2e**, **3c**, **3i** und **3j** mit IC₅₀-Werten im Bereich von 0,1 μM bis 2,7 μM. Wie aus Tabelle 23 zu entnehmen ist, besaßen Tergurid (**1**) und die *N*-1,*N*-1'-substituierten Terguriddimere **1c**, **1d** und **1e** einen moderaten zytotoxischen Effekt mit IC₅₀-Werten zwischen 15,7 μM und 50,1 μM. Festuclavin (**2**) und Pergolid (**3**) sowie die *N,N'*-verknüpften Ergolinoligomere **1a**, **1f**, **1g**, **1h**, **2f**, **2g** und **3k** erwiesen sich als nicht zytotoxisch mit IC₅₀-Werten > 100 μM. Das *N*-1,*N*-1'-verknüpfte Terguridtetramer **1g** mit einem 1,2,4,5-tetrasubstituierten Aromaten als Linkermolekül zeigte eine gute bis moderate antiplasmodiale Aktivität (IC₅₀-Werte: 0,84 μM [PoW], 1,53 μM [Dd2]) und erwies sich ebenfalls als nicht zytotoxisch. Das *N*-1,*N*-1'-substituierte Festuclavin-Trimer **2f** besaß eine gute antiplasmodiale Hemmwirkung mit IC₅₀-Werten von 0,75 μM [PoW] und 0,54 μM [Dd2] und war nicht zytotoxisch. Aus der Gesamtheit der Resultate ergab sich, dass für weiterführende Untersuchungen das *N*-1,*N*-1'-verknüpfte Terguridtetramer **1g** und das *N*-1,*N*-1'-substituierte Festuclavintrimer **2f** von Interesse sind.