

Phytochemische und pharmakologische
Untersuchungen an *Pelargonium sidoides* DC

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
vorgelegt am Fachbereich für Biologie, Chemie und Pharmazie der
Freien Universität Berlin

Tanja Gödecke
2005

aus Seesen

1. Gutachter: Prof. Dr. Kolodziej

2. Gutachter: Prof. Dr. Melzig

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2005

Abstract

The objective of this work was to extend the knowledge of the constituents of *P. sidoides*, especially to differentiate this species from the closely related *P. reniforme*. Both have traditionally been used in southern parts of Africa for the treatment of infections of the respiratory tract, the aerial parts for wound healing. The known metabolic profile of *P. sidoides* could be completed with the isolation of compounds from the less studied aerial parts of this plant species. The group of highly oxygenated coumarins could be further extended by the isolation of **1**, **2** and **3**. According to present evidence, the glucosylated coumarins only occur in *P. sidoides* and seem to be absent in *P. reniforme*. The unique flavonoids **5** and **6**, which are so far only known from *P. reniforme*, were also isolated from this plant source together with the glycosyles orientin and isoorientin. The configuration at the two chiral centres C-2 and C-3 of **7** and the structurally related **8** was determined through CD-spectra as *2R,3R*. **3** and **9** represent new natural products.

Table 1: Newly isolated compounds from the aerial parts of *Pelargonium sidoides*

Compound-class	code	compound
coumarins	1	fraxetin-7- β -glucopyranoside
	2	magnolioside
	3	6,7-dihydroxycumarin-8-sulfate
	4	fraxetine
flavonoids	5	orientin-2''-gallate
	6	isoorientin-2''-gallate
	7	(+)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-taxifolin-3- β -glucopyranoside
	8	(+)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-dihydrokaempferol-3- β -glucopyranoside
phenols	9	4-allyl-2,5-dimethoxyphenol- β -D-glucopyranoside
flavan-3-ols	10	(-)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-epigallocatechin-3-gallate

Extracts and fractions of *P. reniforme* and *P. sidoides* were tested in an MTT-viability-assay against two strains of mycobacteria. They did not show a significant effect on the bacteria growth. Thus, it appears reasonable that the traditional use of the plant in tubercular conditions, may be due to an activation of the immune system, as mycobacteria represent intracellular pathogens. For complement-inhibitory properties, a strong activity of the crude extract, the dichlormethane- and the water-fraction of *P. sidoides* was found, while of the tested compounds only **6** and **10** showed a moderate activity. These results support the traditional use of herbal extracts of *P. sidoides* in wound healing. Furthermore, all tested 3,4-unsubstituted coumarins did not show any activity on the thrombocyte-aggregation as determined in the Born-test.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie, Chemie und Pharmazie, der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kolodziej angefertigt. Für die Überlassung des Themas sowie für viele Anregungen und die ständige Bereitschaft zu Diskussionen bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Kolodziej.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Kaloga für vielseitige Anregungen und Diskussionen sowie für die wertvolle Unterstützung und Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse, insbesondere auch bei der spektroskopischen Auswertung bei der Strukturaufklärung.

Für die großzügige Bereitstellung von getrocknetem Pflanzenmaterial sowie von Extrakten danke ich der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH und Co. KG, Karlsruhe.

Mein Dank gilt Frau Ostwald und Herrn Dr. Holzmann (EI-MS, FAB-MS, HREIMS) sowie Herrn Dr. Schäfer (HMBC-, HMQC- sowie ^1H - und ^{13}C -NMR) vom Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin für die Aufnahme von Spektren und für die freundliche Hilfe bei deren Interpretation, außerdem den Mitarbeitern der analytischen Abteilung am Institut für Pharmazie der Freien Universität, Berlin, für die Anfertigung von Spektren (NMR, IR), besonders Herrn Lindemann (EI-MS) sowie Herrn Dr. Witte für die Ermöglichung der Messung der optischen Drehung.

Herrn Prof. Dr. D. Ferreira, School of Pharmacy, University of Mississippi, USA, danke ich für die Aufnahme von CD-Spektren.

Besonderer Dank gilt Dr. Seidel und Dr. Taylor, School of Pharmacy, London, für einen Gastaufenthalt zur Durchführung von Antimykobakteriellen Testungen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Byung, Korea Research Institute of Biosciences and Biotechnology, Daejeon, Korea, und Frau N. Hermans, Laboratory of Pharmacognosy and Phytochemistry, Universität Antwerpen, Belgien, für die Durchführung und die Diskussion der Ergebnisse von Anti-Komplement Untersuchungen sowie Frau Reitner vom Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin für die Durchführung von Untersuchungen zur Blutgerinnungshemmung.

Ich danke insbesondere Frau Emmrich und Frau Köhler für ihre wertvolle Unterstützung meiner Arbeit und für das freundliche Arbeitsklima, sowie allen, die durch ihre Hilfe und Diskussionsbereitschaft zur Anfertigung der Arbeit beigetragen haben.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Unusual coumarins and antitubercular activity of the aerial parts of *Pelargonium sidoides*,

T. Gödecke, M. Kaloga, H. Kolodziej (2003)

Posterpräsentation auf der 51. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Kiel, 31.08.2003-04.09.2003, P177, Abstractband S. 172

Neue Cumarine und ein Isoeugenolderivat aus *Pelargonium sidoides*

T. Gödecke, M. Kaloga, H. Kolodziej (2004)

Posterpräsentation bei der Veranstaltung "Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor" der Landesgruppe Berlin-Brandenburg der Deutschen pharmazeutischen Gesellschaft, Berlin, 05.06.2004

New coumarins and an isoeugenol derivative from *Pelargonium sidoides*

T. Gödecke, M. Kaloga, H. Kolodziej (2004)

Posterpräsentation auf dem 2004 International Congress on Natural Products Research, Phoenix, AZ, USA, 31.07.04-04.08.04, P252, Abstractband S. 271

A Phenol Glucoside, Uncommon Coumarins and Flavonoids from *Pelargonium sidoides* DC,

T. Gödecke, M. Kaloga, H. Kolodziej (2005)

Zeitschrift für Naturforschung, 60b, 677-684

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	1
1. EINLEITUNG	5
2. AKTUELLER KENNNTNISSTAND DER GATTUNG <i>PELARGONIUM</i>	7
2.1. SYSTEMATISCHE EINORDNUNG VON <i>PELARGONIUM SIDOIDES</i>	7
2.2. BEKANNTE INHALTSSTOFFE	7
2.3. BEKANNTE PHARMAKOLOGISCHE AKTIVITÄT	10
2.3.1. <i>Antibakterielle Aktivität</i>	10
2.3.2. <i>Immunmodulatorische Aktivität</i>	10
2.3.3. <i>Untersuchungen zur Toxizität</i>	11
3. ZIELSETZUNG	12
4. HERSTELLUNG DER EXTRAKTE	13
4.1. EXTRAKTION DER KRAUTDROGE	13
4.2. EXTRAKTION DER WURZELDROGE	13
4.3. VORFRAKTIONIERUNG DER GESAMTEXTRAKTE.....	13
5. PHYTOCHEMISCHE AUFARBEITUNG VON EXTRAKTEN AUS <i>PELARGONIUM SIDOIDES</i>.. 15	
5.1. BEARBEITUNG DER KRAUT-EXTAKTE	15
5.1.1. <i>Auftrennung der Dichlormethan-Fraktion</i>	15
5.1.2. <i>Cumarinabtrennung aus dem Gesamtextrakt</i>	16
5.1.3. <i>Auftrennung der Ethylacetat-Fraktion</i>	16
5.1.4. <i>Auftrennung der 1-Butanol-Fraktion</i>	17
5.1.5. <i>Auftrennung der Wasser-Fraktion als Nachtrennung der Substanzen V3-5</i>	18
5.2. BEARBEITUNG DER WURZEL-EXTRAKTE.....	19
5.2.1. <i>Auftrennung der Ethylacetat-Fraktion</i>	20
5.2.2. <i>Auftrennung der 1-Butanol-Fraktion</i>	20
6. STRUKTURAUFKLÄRUNG VON EINZELSUBSTANZEN	21
6.1. STRUKTURAUFKLÄRUNG VON CUMARINEN (V 1-6)	21
6.1.1. <i>Umckalin (V1)</i>	21
6.1.2. <i>Scopoletin (V2)</i>	23
6.1.3. <i>Fraxetin-7-β-glucopyranosid (V3)</i>	24
6.1.4. <i>7-Methoxycumarin-6-β-glucopyranosid (V4)</i>	25
6.1.5. <i>6,7-Dihydroxycumarin-8-sulfat (V5)</i>	27

6.1.6. 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin (V6)	32
6.3.3. 7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin (= Fraxetin) (V7)	34
6.2. STRUKTURAUFKLÄRUNG EINFACHER PHENOLISCHER VERBINDUNGEN (V 8-10).....	37
6.2.1. 4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1-β-D-glucopyranosid (V8)	37
6.2.2. Gallussäure (V9)	40
6.2.3. Protocatechusäure (V 10).....	41
6.3. STRUKTURAUFKLÄRUNG VON FLAVONOIDEN UND CATECHIN-DERIVATEN.....	43
(V 11-17)	43
6.3.1. (+)-(2R,3R)-Taxifolin-3-β-glucopyranosid (V11)	43
6.3.2. (+)-(2R,3R)-Dihydrokämpferol-3-β-glucopyranosid (V12).....	46
6.3.4. Orientin-2''-gallat (V13).....	49
6.3.5. Isoorientin-2''-gallat (V14).....	53
6.3.6. Orientin (V15)	55
6.3.7. Isoorientin (V16)	59
6.3.8. (-)-(2R,3R)-Epigallocatechin-3-gallat (V17).....	60
7. BIOLOGISCHE AKTIVITÄTEN	65
7.1. UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIMYKOBAKTERIELLEN WIRKUNG.....	65
7.1.1. Historischer Hintergrund	65
7.1.2. Herstellung der Extrakte	66
7.1.3. Mikrodilutionsverfahren.....	66
7.1.4. Ergebnisse	68
7.1.5. Diskussion der Ergebnisse	71
7.2. MODULATION DES KOMPLEMENT-SYSTEMS.....	72
7.2.1. Einleitung	72
7.2.2. Antikomplement-Assay.....	73
7.2.3. Ergebnisse	74
7.2.4. Diskussion der Ergebnisse	75
7.3. HEMMUNG DER THROMBOZYTENAGGREGATION (BORNTTEST).....	76
7.3.1. Einleitung	76
7.3.2. Bestimmung der Thrombozytenaggregationshemmung.....	77
7.3.3. Ergebnisse	78
7.3.4. Diskussion.....	78
8. DISKUSSION	79
8.1. PHYTOCHEMISCHE BEARBEITUNG	79

8.2. BIOLOGISCHE AKTIVITÄTEN.....	81
9. ZUSAMMENFASSUNG.....	85
9.1. ERGEBNISSE DER PHYTOCHEMISCHEN AUFARBEITUNG	85
9.2. BIOLOGISCHE AKTIVITÄTEN.....	86
10. EXPERIMENTELLER TEIL	88
10.1. PFLANZENMATERIAL UND INDUSTRIELL GEFERTIGTE EXTRAKTE.....	88
10.2. GERÄTE–CHEMIKALIEN.....	88
10.2.1. <i>Chemisches Labor</i>	88
10.2.2. <i>Mikrobiologisches Labor</i>	89
10.2.3. <i>Geräte zur Chromatographischen Trennung</i>	89
10.2.4. <i>Spektroskopische Geräte</i>	90
10.2.5. <i>Chemikalien</i>	91
10.3. EXTRAKTGEWINNUNG FÜR DIE ANTIMYKOBAKTERIELLEN TESTUNGEN	94
10.4. EXTRAKTGEWINNUNG FÜR DIE PHYTOCHEMISCHEN ARBEITEN	94
10.4.1. <i>Extraktion des Wurzelmaterials</i>	94
10.4.2. <i>Extraktion des Krautes</i>	95
10.5. AUFARBEITUNG DER WURZELEXTRAKTE VON <i>P. SIDOIDES</i>	96
10.5.1. <i>Aufarbeitung der Ethylacetat-Fraktion</i>	96
10.5.2. <i>Aufarbeitung der 1-Butanol-Fraktion</i>	96
10.6. AUFARBEITUNG DER KRAUTEXTRAKTE VON <i>P. SIDOIDES</i>	99
10.6.1. <i>Aufarbeitung der Dichlormethan-Fraktion</i>	99
10.6.2. <i>Cumarin-Abtrennung aus dem Gesamtextrakt</i>	100
10.6.3. <i>Aufarbeitung der Ethylacetat-Fraktion</i>	100
10.6.4. <i>Aufarbeitung der 1-Butanol-Fraktion/ Wasser-Fraktion</i>	110
10.6.5. <i>Nachisolierung der Verbindungen 3,4 und 5</i>	113
10.7. STRUKTURAUFKLÄRUNG VON EINZELVERBINDUNGEN.....	115
10.7.1. <i>7-Hydroxy-5,6-dimethoxycumarin (= Umckalin (V 1))</i>	115
10.7.2. <i>7-Hydroxy-6-methoxycumarin (= Scopoletin (V 2))</i>	116
10.7.3. <i>8-Hydroxy-6-methoxycumarin-7-β-glucopyranosid (= Fraxetin-7-β-glucopyranosid (V 3))</i>	117
10.7.4. <i>7-Methoxycumarin-6-β-glucopyranosid (= Magnoliosid), (V4)</i>	118
10.7.5. <i>6,7-Dihydroxycumarin-8-sulfat (V5)</i>	120
10.7.6. <i>6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin (V6)</i>	121
10.7.7. <i>7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin (= Fraxetin) (V7)</i>	122

10.7.8. 4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1- β -D-glucopyranosid (V8)	124
10.7.9. Gallussäure (V9)	125
10.7.10. Protocatechusäure (V10).....	126
10.7.11. (+)-(2R,3R)-Taxifolin-3- β -glucopyranosid (V11)	127
10.7.12. (+)-(2R,3R)-Dihydrokämpferol-3- β -glucopyranosid (V12)	129
10.7.13. Orientin-2''-gallat (V13).....	130
10.7.14. Isoorientin-2''-gallat (V14).....	131
10.7.15. Orientin (V15)	132
10.7.16. Isoorientin (V16)	133
10.7.17. (-)-(2R,3R)-Epigallocatechin-3-gallat (V17).....	135
10.8. MIKROBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIK	136
10.8.1. Untersuchungen zur antimykobakteriellen Wirkung von Extrakten.....	136
10.8.2. Untersuchungen zur Modulation des Komplement-Systems	140
10.8.3. Untersuchung zur Hemmung der Thrombozytenaggregation	143
11. LITERATURVERZEICHNIS.....	146
12. VERZEICHNIS DER TABELLEN	161
13. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	164
14. ABBILDUNG DER ISOLIERTEN STRUKTUREN	165
14.1. Cumarine	165
14.2. Einfache phenolische Verbindungen	166
14.3. Flavonoid- und Catechinderivate.....	166